

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平5-502162

⑬ 公表 平成5年(1993)4月22日

⑭ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求
予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

C 12 N 15/68
1/217236-4B
8828-4B

C 12 N 15/00

A※

(全 26 頁)

⑮ 発明の名称 細菌ゲノムにおけるDNAの安定な組込み

⑯ 特 願 平3-501813

⑰ 出 願 平2(1990)12月18日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)6月18日

⑲ 国際出願 PCT/DK90/00332

⑳ 国際公開番号 WO91/09129

㉑ 国際公開日 平3(1991)6月27日

優先権主張 ㉒ 1989年12月18日 ㉓ デンマーク(DK) ㉔ 6396/89

㉕ 発 明 者 ヨーゲンセン, ステーントロ デンマーク国, デーコー-3450 アレロエド, ブルニユスバイ 5
エルス㉖ 出 願 人 ノボ ノルディスク アクティ デンマーク国, デーコー-2880 バグスパエルト, ノボ アレ
ーゼルスカプ (番地なし)

㉗ 代 理 人 弁理士 青木 朗 外3名

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域
特許), FI, FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), N
L(広域特許), NO, SE(広域特許), US

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. 細菌細胞であって、そのゲノム内に該細菌細胞が(1) 対象のDNA配列、(2) 該細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列及び(3) 複製の起点を含んで成る組込み非複製型DNA作製体を保有しており、該DNA作製体は前記の複製起点からの複製の開始に必要なとされる因子をコードする機能的遺伝子を欠いている、前記細菌細胞。

2. 前記DNA作製体が、複製因子をコードする遺伝子を欠失してしまっている、請求の範囲第1項記載の細菌細胞。

3. 前記複製因子をコードする遺伝子が、不活性な複製因子をコードするように改質されているか、又は複製因子が遺伝子から発現されないように改質されている、請求の範囲第1項記載の細胞。

4. 前記遺伝子が遺伝子のDNA配列の1種又はそれ以上のスクレオチドの欠失、挿入又は置換により、又は転写もしくは翻訳開始もしくは停止シグナルの欠失もしくは他の改質により、改質されている、請求の範囲第3項記載の細胞。

5. 前記DNA作製体が、対象のDNA配列細胞の遺伝子の領域に相同性のDNA配列および一本鎖DNAプラスミドから複製のプラス起点を含んでなり、該DNA作製体が複製のプラス起点と同族の機能的rep遺伝子を欠いている、請求の範囲第1〜4項のいずれかに記載の細胞

6. 前記DNA作製体が更に選択できるマーカーを含んでなる、請求の範囲第1〜5項のいずれかに記載の細胞。

7. 前記対象のDNA配列が対象のポリペプチドをコードする、請求の範囲第1〜5項のいずれかに記載の細胞。

8. グラム陽性細菌の細胞である、請求の範囲第1〜7項のいずれかに記載の細胞。

9. 前記グラム陽性細菌の細胞が、バチルス(Bacillus)属又はストレプトマイシス(Streptomyces)属に属する株である、請求の範囲第8項記載の細胞。

10. 前記細胞が、バチルス リシェニフォーミス(Bacillus licheniformis)、バチルス レンタス(Bacillus lentus)、バチルス ブレビス(Bacillus brevis)、バチルス ステアロサーモフィリス(Bacillus stearothermophilus)、バチルス アルカロフィリス(Bacillus alkalophilus)、バチルス アミロリケファシエンシス(Bacillus amyloliquefaciens)、バチルス コアギュランス(Bacillus coagulans)、バチルス スブチリス(Bacillus subtilis)又はストレプトマイシス リビダンス(Streptomyces lividans)の株である、請求の範囲第9項記載の細胞。

11. DNA作製体であって、(1) 対象のDNA配列、(2) 該DNA作製体の導入を意図されている細胞のゲノムの領域に相同性のDNA配列及び(3) 複製の起点を含んで成り、該DNA作成体は、複製の起点からの複製の開始のた

THIS PAGE BLANK (USPTO)

めに必要とされる因子をコードする機能的遺伝子を欠いている、前記DNA作製体。

12. 複製因子をコードする遺伝子を欠失してしまっている、請求の範囲第11項記載のDNA作製体。

13. 前記複製因子をコードする遺伝子が、不活性な複製因子をコードするように改質されているか、又は複製因子が遺伝子から発現されないように改質されている、請求の範囲第11項記載のDNA作製体。

14. 前記遺伝子が、遺伝子のDNA配列の1種又はそれ以上のヌクレオチドの欠失、挿入又は置換により、又は転写もしくは翻訳開始もしくは停止シグナルの欠失もしくは他の改質により、改質されている、請求の範囲第13項記載のDNA作製体。

15. 対象のDNA配列、DNA作製体の導入を意図されている細胞のゲノムの領域に相同性のDNA配列及び一本鎖DNAプラスミドから複製のプラス起点を含んで成り、該DNA作成体は、複製のプラス起点と同族の機能的rep遺伝子を欠いている、前記DNA作製体。

16. 更に選択できるマーカーを含んでなる、請求の範囲第11項に記載のDNA作製体。

17. 請求の範囲第11～16項のいずれかに記載のDNA作製体を含んでなる、組換え体DNAベクター。

18. 親プラスミドベクターであって、(i) 第1の複製起点；(ii) 該第1の複製起点からの複製のために必要とされる複製因子をコードする1又は複数の機能的遺伝子；(iii)

ミドベクターの導入を意図する細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列を含んで成り、該親ベクターは該第2及び第1の複製起点（上記の方向における）の間の領域にある、該第2の複製起点からの複製のために必要とされる複製因子をコードする機能的遺伝子を欠いている、前記親プラスミドベクター。

24. 前記複製の第2のプラス起点が、複製の第1のプラス起点と同じ一本鎖DNAプラスミドから由来する、請求の範囲第23項記載のプラスミドベクター。

25. 更に、選択性マーカーを含んでなる、請求の範囲第18～24項のいずれかに記載のプラスミドベクター。

26. 細菌細胞であって、第1の複製起点および該複製の第1起点からのプラスミド複製に必要とされる（複数の）因子をコードする1又は複数の機能的遺伝子を含んで成る、第1のDNAベクター並びに第2の複製起点（この第2の複製起点からのプラスミド複製に必要とされる因子をコードする機能的遺伝子を欠いている）、対象のDNA配列、及び該プラスミドベクターの導入を意図する細胞のゲノムの領域に相同性のDNA配列を含んで成る、第2のDNAベクターを含んでなる、前記細菌細胞。

27. 前記複製の第2起点が、複製の第1起点と同じプラスミドから由来する、請求の範囲第26項記載の細胞。

28. 前記第2のDNAベクターが、複製の第2起点と同族の複製因子をコードする遺伝子を欠失している、請求の範囲第26項記載の細胞。

該第1の複製起点と同一の方向における第2の複製起点；

(iv) 対象のDNA配列、及び(v) 該ベクターの導入を意図する細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列、を含んで成り、該親ベクターは該第2及び第1の複製起点（上記の順における）の間の領域にある、該第2の複製起点からの複製のために必要とされる複製因子をコードする機能的遺伝子を欠いている、前記親プラスミドベクター。

19. 複製の第2起点が、複製の第1起点と同じプラスミドから由来している、請求の範囲第18項記載のプラスミドベクター。

20. 複製の第2の起点と連結した複製因子をコードする遺伝子が欠失してしまっている、請求の範囲第18項記載のプラスミドベクター。

21. 複製の第2の起点と連結した複製因子をコードする遺伝子が改質されている、請求の範囲第18項記載のプラスミドベクター。

22. 前記遺伝子が、遺伝子のDNA配列の1種又はそれ以上のヌクレオチドの欠失、挿入又は置換により、又は転写もしくは翻訳開始もしくは停止シグナルの欠失により、改質されている、請求の範囲第21項記載のプラスミドベクター。

23. 親プラスミドベクターであって、(i) 一本鎖DNAプラスミドからの第1のプラス起点；(ii) 第1のプラス起点と同族の機能的rep遺伝子；(iii) 該第1のプラス起点と同じ方向における一本鎖DNAプラスミドからの第2のプラス起点；(iv) 対象のDNA配列、及び(v) 該プラス

29. 前記複製の第2の起点と同族の複製因子をコードする遺伝子が改質されている、請求の範囲第26項記載の細胞。

30. 前記遺伝子が遺伝子のDNA配列の1種又はそれ以上のヌクレオチドの欠失、挿入又は置換により、又は転写もしくは翻訳開始もしくは停止シグナルの欠失もしくは他の改質により、改質されている、請求の範囲第29項記載の細胞。

31. 前記第1のDNAベクターが、更に複製の第2の起点と同族の複製因子をコードする機能的遺伝子を含んでなる、請求の範囲第26項記載の細胞。

32. 前記第2のDNAベクターが更に選択できるマーカーを含んでなる、請求の範囲第26項に記載の細胞。

33. 一本鎖DNAプラスミドからの複製の第1のプラス起点および機能的rep遺伝子を含んでなる第1のDNAベクター、並びに一本鎖DNAプラスミドからの複製の第2のプラス起点（これは、複製の第2のプラス起点と同族の機能的rep遺伝子を欠いている）、対象のDNA配列および該細胞のゲノムの領域に相同性のDNA配列を含んでなる第2のDNAベクターを含んでなる、請求の範囲第26～32項のいずれかに記載の細胞。

34. 前記複製の第2のプラス起点が、複製の第1のプラス起点と同じ一本鎖DNAプラスミドから由来する、請求の範囲第33項記載の細胞。

35. グラム陽性細菌の細胞である、請求の範囲第26～34項のいずれかに記載の細胞。

36. 前記グラム陽性細菌の細胞が、バチルス

(*Bacillus*) 属又はストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属に属する株である、請求の範囲第35項記載の細胞。

37. 前記細胞が、バチルス リシェニフォーミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス レンタス (*Bacillus lentus*)、バチルス プレビス (*Bacillus brevis*)、バチルス ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス アルカロフィルス (*Bacillus alkalophilus*)、バチルス アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス コアギュランス (*Bacillus coagulans*)、バチルス スプチリス (*Bacillus subtilis*) 又はストレプトマイセス リビダンス (*Streptomyces lividans*) の株である、請求の範囲第36項記載の細胞。

38. 請求の範囲第1~10項のいずれかに記載の細菌細胞の調製方法であって、該方法が、請求の範囲第18~25項のいずれかに記載の親プラスミドベクターを用いて細菌細胞を形質転換し、次いで選択的条件下で形質転換された細胞を培養し、該プラスミドベクターの複製が、第1の複製起点および該第1の複製起点からのプラスミドの複製に対して要求される(複製の)因子をコードする1組又はそれ以上の機能的遺伝子を含んでなる第1の子孫ベクター並びに第2の複製起点(該第2の複製起点からプラスミド複製に対して要求

される因子をコードする機能的遺伝子を欠いている)および対象のDNA配列および細胞のゲノムの領域に相同性のDNA配列を含んでなる第2の子孫ベクターの形成をもたらす、次いで選択的条件下で形質転換された細胞の培養を継続し、相同性組換えにより該第2の子孫ベクターを細菌ゲノム内に組み込み更に細胞からの第1の子孫ベクターおよび親ベクターの消失をもたらす、前記方法。

39. 前記親プラスミドベクターが、まだ宿主細胞を増殖せしめるような増加せしめられた温度では複製できないものであり、更に細菌細胞をプラスミドの複製を許容する温度で最初に培養し、第二の子孫ベクターを細菌ゲノムに組み込んだ後、プラスミドの複製を許容しない温度で培養し、その結果第1の子孫ベクターおよび親ベクターが細胞から消失している、請求の範囲第38項記載の方法。

40. 請求の範囲第1~10項のいずれかに記載の細菌細胞の製造方法であって、第1の複製起点および該第1の複製起点からのプラスミドの複製に対して要求される(複製の)因子をコードする1組又はそれ以上の機能的遺伝子を含んでなる第1の子孫ベクター並びに第2の複製起点(該第2の複製起点からプラスミド複製に対して要求される因子をコードする機能的遺伝子を欠いている)および対象のDNA配列および細胞のゲノムの領域に相同性のDNA配列を含んでなる第2の子孫ベクターを用いて細菌細胞を形質転換し、次いで選択的条件下で得られた細胞を培養し、相同性組換えにより該第2の子孫ベクターを細菌ゲノム内に組み込み更に第1の子孫

明 細 書

ベクターの消失をもたらす、前記方法。

41. 前記第1のDNAベクターが、まだ宿主細胞を増殖せしめるような増加せしめられた温度では複製できないものであり、更に細菌細胞をプラスミドの複製を許容する温度で最初に培養し、第二のDNAベクターを細菌ゲノムに組み込んだ後、プラスミドの複製を許容しない温度で培養し、その結果第1のDNAベクター細胞から失われている請求の範囲第40項記載の方法。

42. 前記第1のDNAベクターが、更に第2の複製起点から複製に対して要求される複製因子をコードする機能的遺伝子を1組又はそれ以上含んでなる請求の範囲第40項記載の方法。

43. 対象のポリペプチドの調製方法であって、該ポリペプチドに対しコードする組込まれたDNA配列を有する請求の範囲第1~10項のいずれかに記載の細菌細胞を、ポリペプチドの生産に及びく条件下で培養し、次いで得られたポリペプチドを培養物から回収することを含んでなる、前記方法。

44. ポリペプチドが、酵素、すなわちプロテアーゼ、アミラーゼ又はリパーゼである、請求の範囲第43項記載の方法。

細菌ゲノムにおけるDNAの安定な組み込み

発明の分野

本発明は、ゲノムに組み込まれているDNA複製体を含んで成る細菌細胞、細菌細胞のゲノムに組み込まれることを目的とするDNA複製体、該DNA複製体を含んで成るプラスミドベクター、及び細菌ゲノムの中にDNA複製体を組み込む方法に関する。

発明の背景

組換えDNA方法による所望するポリペプチドの生産の目的のため、該ポリペプチドをコードする挿入されている遺伝子情報線を保有する組換えプラスミドベクターによって細菌細胞を形質転換せしめる場合、このようなプラスミドはたとえそれら自体はこの細胞において安定的に遺伝せうとしても不安定になることがある。この不安定さは細胞において該プラスミドが不安定に維持されることによって該プラスミドが事実上細胞集団から消失するか、又は対象のタンパク質がコードするDNAが該プラスミドから欠失せうかのいつれかの形をとる。先の問題を解決するための伝統的な方法は、淘汰圧のもとで、即ち、典型的には、該細胞に形質転換されているプラスミド上の抗生物質に対する耐性を授ける生成物をコードする遺伝子の存在に基づいて対象の細胞が耐性とな

っている抗生物質の存在下においてこの形質転換細胞を増殖せしめることであった。しかしながら、この手法は対象の抗生物質の高価格に基づき大量生産において経済的に実施できず、又は環境的理由により所望されていない。培養培地における抗生物質の利用は衛生局等により認可される生成物を得ることをより困難にもする。

プラスミドを安定化させるためにそれらに、細胞分裂における子孫細胞へのプラスミドの均等な分配を確実にせしめる分配機能をコードするDNA配列を挿入せしめることが従来提案されている。クローン化DNA配列の安定な遺伝を達成せしめる他の方法は、このようなDNA配列の組込みを宿主細胞のゲノムに施すことである。現状のプラスミドベクターへのDNA配列の組込みは、例えばA. Campbell, Advances Genet. 11, 1962, 頁101-145に詳細されているいわゆる「交差」方法により行なわれうる。この方法に従ってプラスミドベクターに、細菌ゲノム上の領域と相同性のDNA配列、又は他方で、組込む異種DNA配列の両側に置かれる2つの相同性配列が付与される。その後の組込え操作において、このベクター上相同性配列及び隣接配列は宿主ゲノムの中に相同性領域にて組込まれる。ところである場合において、組込まれたDNA配列は淘汰圧の非存在下において、例えばDNAの組込みに重要な類似のタイプの相同性組換現象によってこの細胞から消失されることが思い出されている。特に、相同性のDNA配列間の組換えは宿主細胞ゲノムに組込まれているDNA上、又は

ために必要とされる因子をコードする機能的遺伝子を欠いているDNA作製体に関する。

本明細書において、「非複製型DNA作製体」なる語は、自立的に複製することができず、従って宿主細胞ゲノムと一緒に複製されるDNA配列を意味することを意図している。該ゲノムは染色体及び安定的に遺伝される染色体外因子を含んで成る。「対象のDNA配列」なる語は、所望のRNAもしくはタンパク質生成物（宿主細胞に異種又は天然のもの）をコードしうる配列、又はそれ自身が宿主細胞に所望の性質、例えば以降に記載の突然変異表現型を授ける配列を表わすために用いている。

該相同性DNA配列は一般に宿主細胞のゲノムに由来するものであり、そして該宿主細胞の生存又は適切な機能のために本質的でないゲノムの領域に相同性のものでありうる。他方、該相同性DNA配列は、相同性組換えによる本発明のDNA作製体の組込みは細胞に突然変異表現型（該DNA作製体が組込まれている細胞の選択のためのマーカーとして働きうるもの）を発現させることをもたらしうるようによばれることもできる。例えばもしこのDNA作製体を転写ユニットを分断しながらその中に組込む場合、この転写ユニット内に含まれる1又は複数の遺伝子はこれによって発現されなくなる。他方、該相同性DNA配列は、宿主ゲノムにとって天然ではないが、その他の生物からクローンされ、又は合成され、そしてその後本発明のDNA作製体の組込みの前に任意の常用の方法、例えば交差によって該宿主ゲノムの中に導入され

その付近に存在する複製型DNAの近傍において刺激されることが既に観察されている。Ph. Noirot 5, J. Mol. Biol. 196, 1987, 頁39-48; 及びM. YoungとS. D. Ehrlich, J. Bacteriol. 171 (5), 1989年5月, 頁2653-2656を参照のこと。

従って本発明の目的はゲノムDNA、例えば細菌宿主細胞の染色体の中へのDNA配列の安定な組込みの提供にある。

発明の概要

本発明は、宿主細胞のゲノムの中へのDNA配列の安定な組込みが、該組込むDNAにおける機能的なプラスミド複製システムの存在を追い出すことにより得られうることの発見に基づく。

従って、一つの観点において、本発明は細菌細胞であって、そのゲノム中に(1)対象のDNA配列、(2)該細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列及び(3)複製の起点を含んで成る組込み非複製型DNA作製体を保有している細胞に関する。ここで該DNA作製体は前記の複製起点からの複製の開始に必要なとされる因子をコードする機能的遺伝子を欠いている。

他の観点において、本発明はDNA作製体であって、(1)対象のDNA配列、(2)該DNA作製体の導入を意図されている細胞のゲノムの領域に相同性のDNA配列及び(3)複製の起点を含んで成り、該複製の起点からの複製の開始の

うるものでありうる。該相同性DNA配列は問題の宿主細胞にとって天然であるか異種であるかは関係なく、対象のDNA配列を含んで成る又はそれより構成されるものでありうる（例えば、細胞において対象のDNA配列のコピー数の増幅を所望する場合における細胞にとっての性質については以下を参照のこと）。本明細書において「相同性」なる語は少なくとも9個の連続塩基対が同一である配列として定義されうることが理解されるべきである。

本発明の詳細な説明

本発明に関して、細菌ゲノムの中へのDNAの安定な組込みを特定のタイプの複製システム（いわゆるローリングサークル型複製；以下参照）を有するプラスミドについて示しているが、プラスミド上のシス作用配列（このようなシス作用DNA配列は複製起点と総称されている）からの複製の開始のために1又は複数のトランス作用因子（即ち、RNAもしくはタンパク質因子）を必要とするメカニズムにより複製される全てのプラスミドが本目的に有用でありうることも通常予測される。プラスミド複製のために不可欠な因子を以下、複製因子と称する。該DNA作製体が、該DNA作製体上に含まれている複製起点により必要とされる複製因子をコードする機能的な遺伝子を欠く場合、活性複製因子は生産されず、その結果としてこの起点からの複製は開始されない。

必要とされる複製因子をコードする機能的遺伝子を欠く本発明のDNA作製体を得るため、該遺伝子全体を削除するこ

と又はそれが不活性な複製因子をコードするようにこれを改質せしめることのいずれかを行うことができる。該遺伝子のこのような改質は、周知の方法における該遺伝子のDNA配列の1又は複数のヌクレオチドの欠失、挿入又は置換によるか、あるいは転写又は翻訳の開始もしくは停止シグナルの同様の改質により実施されうる。

上述した複製システムは本発明の細菌細胞の作製方法に利用されうる。本発明の一態様において、親ベクターと称する本目的のためのプラスミドベクターをまず作製する。該親ベクターは (i) 第1の複製起点; (ii) 該第1の複製起点からの複製のために必要とされる複製因子をコードする1又は複数の機能的遺伝子; (iii) 該第1の複製起点と同一の方向における第2の複製起点; (iv) 対象のDNA配列、及び (v) 該ベクターの導入を意図する細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列、を含んで成り、該親ベクターは該第2及び第1の複製起点 (上記の順における) の間の領域にある、該第2の複製起点からの複製のために必要とされる複製因子をコードする機能的遺伝子を欠いている。本明細書における「プラスミド」なる語は、自立複製型体外染色体因子として機能できるバクテリオファージ又はその他のDNA分子を表わすことを意図していることも理解されるべきである。

本発明に従い、この親ベクターを次に細菌細胞の中に形質転換せしめ、そしてこの形質転換細胞を該ベクターの複製を可能とする条件のもとで培養せしめる。

該形質転換細胞における該親ベクターの複製は2種類の異

なる子孫ベクターの形成を生じせしめる。

第1の子孫ベクターは (i) 第1の複製起点; (ii) 該起点からの複製に必要とされる (複製の) 複製因子をコードする1又は複数の遺伝子、を含んで成る。第2の子孫ベクターは、(iii) 第2の複製起点; (iv) 対象のDNA配列、及び該プラスミドベクターの導入を意図する細胞のゲノムの領域に相同性のDNA配列を含んで成り、該第2子孫ベクターはこれが保有する該第2の複製起点からの複製に必要とされる複製因子をコードする機能的遺伝子を欠いている。親ベクターからの2種類の子孫ベクター分子の形成は種々のメカニズムにより行なわれる。即ち、該プラスミドの複製の方法、例えば一本鎖DNAプラスミドのローリングサークル複製 (以降参照) の結果であるか、又は該プラスミドベクター上に存在する2つの複製起点を含む及び/もしくはそれらに隣接するDNA領域間の相同性組換えの結果として行なわれる。

該第2起点が該親プラスミド上に該第1起点と同一の方向性において置かれている場合、該細菌ゲノムの中に組込んで該第2起点の下流ではあるが該第1起点の上流に位置せしめることを意図する種々のDNA配列 (即ち、対象のDNA配列及び細胞のゲノムに相同性のDNA配列) はプラスミド複製の後に第2の子孫ベクター上に存在しているであろう。形質転換細胞の培養を続けることは相同性組換えによる該細菌ゲノムへの前記の第2子孫ベクターの組込み及び該細胞からの第1子孫ベクターの消失を、一定の頻度により自発的にもたらしうる。

該第2子孫ベクターを組込んだゲノムにおける細胞についての選別を促進せしめるため、このベクターは選択マーカーが好適に付与されている。この場合において、該細胞を選択条件、即ち、該選択マーカーの保持されている細胞のみが生存しうる条件のもとで培養することができる。この選択マーカーは細胞に抗生物質耐性を授ける、又は栄養要求変異株に原栄養性を授ける生成物をコードする遺伝子でありうる (例えば、*dal*株に導入されている*dal*遺伝子; B. Diderichsen

(例えば、*dal*株に導入されている*dal*遺伝子; B. Diderichsen の *Bacillus: Molecular Genetics and Biotechnology Application*, A.T. Ganesan and J.A. Hoch 編, Academic Press, 1986, 頁35-46 を参照のこと)。これらの条件のもとで生存

する細胞は親プラスミドベクターを含むか、もしくは細胞における親ベクターの複製に基づいて形成される両方の子孫ベクターを含む細胞であるか、又は本発明のDNA複製体を含んで成る第2子孫ベクターが組込まれている細胞のいずれかである。該親ベクター及び第1子孫ベクターは事実上消失しており、そして本発明のDNA複製体を含んで成る該第2子孫ベクターは高頻度でこの宿主ゲノムの中に自発的に組込まれていることが驚くべきことに見い出された。

該DNA複製体の組込みが行なわれる効率を高めることを所望する場合、該親ベクターとして、一定 (許容) 条件のもとで複製でき、且つ他 (非許容) の条件のもとでは複製できないプラスミドが利用されうる。このプラスミドは例えば複製に関して温度感受性のものでありうる。従って、本発明の方法の態様において、該親ベクターは高い温度では複製でき

ないが、しかし宿主の増殖は可能とするものである。該細菌細胞をまず室温で培養してプラスミド複製及び2種類の子孫ベクターの形成を行い、その後、細菌ゲノムの中への本発明のDNA複製体を含んで成る第2子孫ベクターの組込みを行なった後に、該第1子孫ベクター及び該親ベクターが該細胞から消失するようプラスミド複製が可能でない温度で培養する。非許容温度での培養は、適当な選択マーカーを含む組込まれたDNA複製体を含む細胞のみが生存することを確実にせしめる選択条件のもとで行う。

組込みの効率及び細胞からの第1子孫ベクターのその後の消失を高める他の方法は、前記の通りの選択条件下で宿主細胞を培養せしめた後に、この親ベクターにより形質転換されている細胞をプラスミドキユアリング剤、例えばノボビオシン (*novobiocin*) (Gado, I. ら、1987, *Zbl. Bakt. Hyg. A*, 265, 136-145) により処理することでありうる。

同一の親ベクター上に2種類の異なるプラスミドに由来する複製起点を利用することが可能である。これは該第1及び第2複製起点の両方からの複製を開始させることができる同一の (複製の) 複製因子により機能化されるために互いに十分に類似していることを条件とする。他方、該プラスミドベクターは前記した相同性組換えがなされるために相同性領域を含むべきである。しかしながら、第1の複製起点 (及びそれに結合している、複製因子をコードする遺伝子) は、本発明が基礎とする複製メカニズムが最大に機能することを阻害

にするために第2複製起点と同一のプラスミドに由来することが好ましい。

実用的な理由により、該第1及び第2の複製起点からの複製が開始されることのできない、又はこれらの起点からの複製の速度が非常に遅い生物において、該プラスミドベクターの初期作製を行うことが好ましいことがある。従ってこのプラスミドベクターは、該ベクターが2種類の異なる生物において複製されることができるようにする、更なる複製起点の付与されているシャトルベクターでありうる。この更なる複製起点は例えばエッシャーヒア コリ (*Escherichia coli*) において機能するものでありうる。この生物はよく詳細されており、そして組換えDNA実験のために常用されており、それ故組換えDNA操作によってプラスミドを作製するために適切である。更にこのシャトルベクターは更なる選択マーカー、例えば抗生物質耐性遺伝子を、E. コリにおけるベクターの選別のために含んで成りうる。更なる複製起点及び選択マーカーは第1起点及び/又は複製因子の後ではあるが第2起点を超えないことが好ましく、これによってこの第1及び第2起点からのベクターの複製に基づき、これらの更なる配列は、親ベクターにより形質転換されている細菌細胞から事実上消失する第1子孫ベクターに保有されるであろう。

本発明の細菌細胞の生産の他の方法において、宿主細胞を、第1の複製起点からのプラスミド複製のために必要とされる因子をコードする機能的遺伝子が結合している第1の複製起

点を含んだ上記の非複製型DNA作製体を含む細胞の両方の作製方法において形成される中間体は、第1複製起点からのプラスミド複製のために必要とされる(複製の)因子をコードする1又は複数の機能的遺伝子が結合している第1の複製起点を含んで成る第1 DNAベクター、更には第2の複製起点、並びに対象のDNA配列及び該細胞のゲノムの領域に相同性であるDNA配列を含んで成る第2 DNAベクターを含んで成り、該第2ベクターはこれが保有する複製起点からの複製のために必要な複製因子をコードする機能的遺伝子を欠いている。

第2 DNAベクター上の複製起点であって、該起点からの複製のために必要とされる複製因子をコードする機能的遺伝子を欠いているものを得るため、この遺伝子を該ベクターから欠失せしめること、又はそれを前記した方法において改質せしめることが可能である。特に2種類の異なる複製起点を利用する場合、該第1ベクターは該第2複製起点からの複製を開始せしめるのに必要な複製因子をコードする遺伝子をも付与されることがありうる。この方法において、該第2 DNAベクターの複製は該第1 DNAベクターから生産された第2の複製因子に依存し、従って該第1ベクターがこの細胞から消失した場合該第2ベクターは非複製型となる。しかしながら、この第1及び第2の複製起点は同一のプラスミドに由来することもでき、この場合においては完全な複製因子をコードする1種の遺伝子のみがこの第1ベクター上に必要とされる。

点を含んで成る第1 DNAベクターにより形質転換せしめ、そしてその後又はそれと同時に、第2の複製起点からのプラスミド複製のために必要とされる因子をコードする結合した機能的遺伝子を欠き、第2の複製起点並びに対象のDNA配列及び該細胞のゲノムの領域に相同性のDNA配列を含んで成る第2 DNAベクターによる共形質転換によって形質転換せしめる。該第2ベクターは選択マーカーも付与されていることが好ましい。次に該第1及び第2 DNAベクターを含む得られる細胞を好ましくは前記の選択条件下で培養せしめ、このことは相同性組換えによる細菌ゲノムの中への該第2ベクターの組み込み及び該第1ベクターの消失を事実上もたらし、従って選別は必要とされない。上記の方法においてはまず一種類のプラスミドベクターを利用するため、この第1 DNAベクターはその複製が該ベクターにより形質転換されている細胞を培養するための許容及び非許容条件に依存するものでありうる。従って本発明の方法における該第1 DNAベクターは、高い温度で複製することはできないがしかし宿主細胞の増殖は可能とするものであり、それ故細菌細胞をまずプラスミド複製の可能な温度で培養し、その後、該細菌ゲノムの中に、該第2 DNAベクターを組み込んだ後に、プラスミド複製のできない温度で培養して該第1 DNAベクターをこの細胞から消失させ、そして選択条件のもとで培養して該第2 DNAベクターの組み込まれた細胞のみが生存できるようにする。同様に、この形質転換細胞を前記したプラスミドキュアリング剤により処理することがある。

本発明の目的のため、該プラスミドベクター又は該第1と第2 DNAベクターが中に形質転換される細菌細胞はグラム陰性及びグラム陽性の両者でありうるが、グラム陽性細菌の細胞が好ましく、なぜならグラム陰性菌からよりもグラム陽性菌からポリペプチドの細胞外発現を得ることが一般的に容易であるからである。従って、該細菌はバチルス (*Bacillus*) 又はストレプトマイシス (*Streptomyces*) 属に属する株、特にバチルス リシェニフォーミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス レンタス (*Bacillus lentus*)、バチルス プレビス (*Bacillus brevis*)、バチルス ステアロサーモフィリス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス アルカロフィルス (*Bacillus alkalophilus*)、バチルス アミロリケファシエンシス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス コアギュランシス (*Bacillus coagulans*)、バチルス スブチリス (*Bacillus subtilis*) 又はストレプトマイシス リビダシス (*Streptomyces lividans*) の株でありうる。

本発明は、現状ではコンピテントにすることによっても形質転換できない(又は少なくとも、その天然の受容メカニズムが未だ明らかにされていないもの)が、例えばプロトプラスト形成もしくはエレクトロポレーションを含む操作により形質転換されうる細菌、例えばバチルス リシェニフォーミ

ス又はバチルス・レンタスの一定の株のゲノムに対象のDNA配列の安定な相溶性組込みを提供する唯一の有効な方法と考えられる。従って本方法は、このような生物における有効な形質転換及びDNAの安定な組込みが特に重視される。形質転換率が低い、典型的にはDNA μ g 当り 10~50 個の形質転換体 (DNA μ g 当りの形質転換体が典型的に 10^4 ~ 10^5 個のオーダーである例えばコンピテントE. コリ又はB. スプテリスと比較して) におけるような生物に関して特に注目される。

本発明の細菌細胞において、対象のDNA配列は便宜上対象のポリペプチドをコードするものであり、そしてこの結果として本発明は対象のポリペプチドを生産する方法であって、該ポリペプチドの生産を助成する条件のもとで、該ポリペプチドをコードする組込まれているDNA配列を含む本発明に関する細菌細胞を培養せしめ、そして得られるポリペプチドをこの培養物から回収せしめることを含んで成る方法に関する。本方法により生産されるポリペプチドは細菌において有利に生産されるあらゆるポリペプチド、例えば酵素、例えばプロテアーゼ、アミラーゼ又はリパーゼでありうる。

本発明の好ましい態様の説明

グラム陽性菌由来のプラスミドの大集団を、複製中間体として一本鎖DNAを作り上げるいわゆる「ローリングサークル型複製」メカニズムにより複製せしめる。複製は、プラスミドコード化タンパク質Repが複製起点配列(プラス起点)

のプラス起点と同一の方向性における、一本鎖DNAプラスミド由来の第2のプラス起点；(iv) 対象のDNA配列、及び(v) 該プラスミドベクターの導入を意図する細胞のゲノムの領域に相溶性であるDNA配列、を含んで成る親プラスミドベクターを用いる本発明の方法により作製されることができ、該親ベクターは該第2と該第1プラス起点との間の上記と同一の方向における領域において該第2プラス起点と同族の機能的rep遺伝子を欠いている。

該親ベクターの複製に基づき、第1及び第2子孫DNAベクターが、おそらく以下のメカニズムに従って形成される：

Repタンパク質は該第1プラス起点にニックを作り上げることで複製を開始させ、そして該第2のプラス起点にてニックを作り上げるために進む。追い出された鎖は再リゲートして、一本鎖DNAプラスミド由来の第1プラス複製起点及び該第1プラス起点と同族の機能的rep遺伝子を含んで成る第1子孫ベクターを形成する。同様に、このRepタンパク質はこの第2プラス起点から進行してこの第1プラス起点にニックを作り上げ、このようにして、追い出された鎖の再リゲーション及び一本鎖DNAから二本鎖DNAへの変換に基づき、第2プラス複製起点と同族の機能的rep遺伝子を欠く、一本鎖DNAプラスミド由来の第2プラス複製起点、並びに対象のDNA配列及び該細胞のゲノムの領域に相溶性であるDNA配列を含んで成る第2子孫ベクターが形成される。この第2子孫ベクターは機能的rep遺伝子を含まないため、この分子の複製は該第1子孫ベクター又は親ベク

を認識し、そしてDNA鎖の一方に(プラス鎖)ニックを生じた場合に開始される。このプラス鎖を次に追い出し、そして新たなプラス鎖を3'-OH伸長によってこのニックから重合せしめる。このRepタンパク質がその後終止配列(これはプラス起点に重合している)を認識した時、完全に複製された鎖及び追い出された鎖の一本鎖DNAモノマーを作り上げるための最初の箇所と同じ位置にて第2のニックが作られ、これらの末端は環状分子を形成するためにリゲートする。次いで宿主因子は一本鎖DNA分子の二本鎖DNAへの変換を促進する(このタイプのプラスミドのより詳細な説明については、A. GrussとS. D. EhrlichのMicrobiological Reviews 53 (2), 1989年6月、頁231-241を参照のこと)。本目的に関し、この複製システムを伴うプラスミドを一本鎖DNAプラスミドと称する。

ローリングサークル型複製メカニズムは、対象のDNA配列及び細胞のゲノムの領域に相溶性であるDNA配列とは別に、プラス複製起点と同族の機能的rep遺伝子を欠いた、一本鎖DNAプラスミド由来のプラス複製起点を含んで成るDNA作製体を保有する本発明に関する細菌細胞を生産するために、本発明に従って利用できることが望くべきことに見い出された。

この細菌細胞は、親プラスミドベクターであって(i) 一本鎖DNAプラスミド由来の第1のプラス起点；(ii) 該第1のプラス起点と同族の機能的rep遺伝子；(iii) 該第1

ターのいずれかからの翻訳において供給されるRepタンパク質に全体的に依存する。

他方、この2種類の子孫ベクターは親ベクター上に存在する2つの起点を含む及び/又はそれに近傍の相溶性DNA領域間の組換えの結果としても形成されうる。

前記の親プラスミドにおける第1プラス起点が、プラスミド複製の終結を確実にするには十分であるが機能的な起点を構成するには小さすぎる、起点領域由来の小さなDNAフラグメントによって置換されている場合、機能的複製起点を有さない第2子孫ベクターが形成されうる。このようなフラグメントはpUB110 (Boeら、1989, J. Bacteriol., 171, 3366-3372) 及びpC194 (Grosら、1987, EMBO J., 6, 3863-3869) において同定されている。

該細菌細胞は、機能的なrep遺伝子の結合した一本鎖DNAプラスミド由来の第1プラス複製起点を含んで成る第1DNAベクターにより宿主細胞を形質転換せしめ、そしてその後又は同時に、共形質転換によって該宿主細胞を、第2プラス複製起点と同族の機能的rep遺伝子は欠くが、対象のDNA配列及び該細胞のゲノムの領域に相溶性であるDNA配列を含んで成る、一本鎖DNAプラスミド由来の第2プラス複製起点を含んで成る第2DNAベクターにより形質転換せしめること、を含んで成る本発明の方法によって択一的に作製されうる。この第2DNAベクターはこの第1DNAベクターから供給されるRepタンパク質の存在に基づいて細

胞に維持される。

該親ベクター又は第2 DNAベクターが改質 rep 遺伝子を含んで成る場合、第2 プラス起点はこの改質 rep 遺伝子の前方に置くか又はその中に置くことができる。前記した通り、この第2 プラス起点は第1 プラス起点と同一又は異なるプラスミドに由来しうる。この第1 及び第2 プラス起点が異なるプラスミドに由来し、従って複製が同一の Rep タンパク質によって両方の起点から開始されない場合、この第1 DNAベクターはこの第2 プラス起点からの複製を開始せしめることができる活性 Rep タンパク質をコードする rep 遺伝子を更に含むことができる。この親ベクター又は第2 DNAベクターは前記した選択マーカーも含んで成ることができる。

組込み工程を向上させる好ましい態様において、ベクターであってその複製が宿主を培養せしめる温度を含む許容条件に依存するものが利用できる。従って、該第1 及び第2 DNAベクターを含む宿主細胞をプラスミド複製のための許容温度で培養せしめる場合、この第1 DNAベクターから作られる Rep タンパク質は該細胞において第2 DNAベクターを維持させるために働くであろう。しかしながら、該第1 DNAベクターが複製することのできない非許容温度では、この第1 ベクター及びその結果それより作られる Rep タンパク質はこの細胞から消失し、従ってこの第2 DNAベクターはもはや複製することができなくなるであろう。淘汰圧、例えば抗生物質の存在下のもとで培養を続けることにより、選択

マーカーをコードする遺伝子を含む本発明の挿入 DNA 作製体をゲノムの中に含む細胞のみが生存し続ける。

該 DNA 作製体が宿主細胞のゲノムに組込まれたなら、これらは淘汰圧の非存在下において細胞からの該 DNA 作製体又はその一部の結果的な消失を伴うことなく培養されうること注目すべきである。このことは、この組込まれた DNA が自立複製できないが、宿主ゲノムと一緒に複製される事実起因すると考えられている。この組込まれた DNA の自立複製の欠如は、組換えプロセスに重要であると考えられている一本鎖 DNA 中間体の形成がなされず、従って組込まれた DNA は該宿主ゲノムから除去されていることを意味する (参照文献: Ph. Noiret ら、J. Mol. Biol. 196, 1987, 頁39-48; 及び M. Young と S. D. Ehrlich, J. Bacteriol. 171 (5), 1989年5月, 頁2653-2656)。

この組込まれた DNA 作製体を、高めた淘汰圧、例えば高い濃度の抗生物質のもとで形質転換細胞を培養せしめることにより増幅することが可能であることが見い出されている。淘汰圧の非存在下において、このような増幅コピーはしばしば細胞から消失することが見い出されている (参照文献)。これに比べ、本発明は細菌細胞であってその中に組込まれている DNA 配列の増幅コピーが宿主において安定に維持されている細胞を提供し、なぜなら前記した通りこの組込まれている DNA は非複製型であるからである。本発明を主として異種 DNA 配列の組込みに適するものとして上述してきたが、

本発明は特定の遺伝子生成物の生産を高めるため、宿主細胞に相同性である遺伝子の増幅されたコピー数を得るためにも適切であることを注目すべきである。

図面の簡単な説明

本発明を添付した図面を参照しながら更に説明する。ここ

で:
図1はプラスミド pDN3000の制限地図を示し、
図2はプラスミド pE194の制限地図を示し、
図3はプラスミド pPL1975の制限地図を示し、
図4はプラスミド pSX120の制限地図を示し、
図5はプラスミド pPL2002の制限地図を示し、
図6はプラスミド pDN3060の制限地図を示し、
図7はプラスミド pSJ1085の制限地図を示し、
図8はプラスミド pUC19の制限地図を示し、
図9はプラスミド pSJ1103の制限地図を示し、
図10はプラスミド pSJ1130の制限地図を示し、
図11はプラスミド pSJ1136の制限地図を示し、
図12はプラスミド pSJ1137の制限地図を示し、
図13はプラスミド pPL1484の制限地図を示し、
図14はプラスミド pSJ1155の制限地図を示し、
図15はプラスミド pSJ1157の制限地図を示し、
図16はプラスミド pSJ1259の制限地図を示し、
図17はプラスミド pDN2904の制限地図を示し、
図18はプラスミド pSJ1139の制限地図を示し、

図19はプラスミド pSJ1139aの制限地図を示し、
図20はプラスミド pSJ1139bの制限地図を示し、
図21はプラスミド p d n 3020の制限地図を示し、
図22はプラスミド pPL1878の制限地図を示し、
図23はプラスミド pPL1896の制限地図を示し、
図24はプラスミド pSJ993の制限地図を示し、
図25はプラスミド pSJ1163の制限地図を示し、
図26はプラスミド pSJ1136aの制限地図を示し、
図27はプラスミド pSJ1163bの制限地図を示し、
図28はプラスミド pSJ1259aの制限地図を示し、
図29はプラスミド pSJ1555の制限地図を示し、
図30はプラスミド pSJ1555aの制限地図を示し、
そして

図31はプラスミド pSJ1555bの制限地図を示す。

全ての図面において、矢印は転写の方向を示す。

見易くするため、複製起点 (+ori pUB 110, +ori pE 194, ori pUC 19) は、たとえ機能的な起点が大きめの DNA 領域より構成されていても、複製に関する事実上の開始部位により表示した。

本発明を以下の実施例において更に説明する。これらは本発明の範囲を限定する意図はない。

材料及び方法

プラスミド

pBD64 : Gryczan ら、1980に詳細。

pDN3060: 多数の有用な制限部位を含む合成オリゴヌクレオチドの挿入によってバチルス属プラスミドpDN1050 (Diderichsen, B., 1986) より得られるクローニングベクター。制限地図を図6に示す。

pDN2904: クロラムフェニコール耐性遺伝子及びカナマイシン耐性遺伝子の両方を含む、バチルス属プラスミドpUB110 (Gryczanら, 1978) の誘導体。制限地図は図17に示す。

pPL1484: カナマイシン耐性遺伝子を含むpDN2904由来の1.4kbのBamHIフラグメントの挿入されている改質ポリリンカー領域を含む、pUC19 (Yanisch-Perronら, 1985) の誘導体。制限地図は図13に示す。

pPL1878: サーモアナエロバクター (Thermoaerobacter) 種ATCC53627を起源とするシクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ (CGTase) をコードする2.4kbのHaeIII-SphIフラグメントを含むpDN1380 (DiderichsenとChristiansen, 1988に詳細)。この遺

CO₂ (0.1M) を加えることによって8.5に調整。

TY9 アガー: トリブチカーゼ 20g/l
酵母抽出物 5g/l
FeCl₂ · 4H₂O 6mg/l
MnCl₂ · 4H₂O 1mg/l
MgSO₄ · 7H₂O 15mg/l
バクトアガー 5g/l
NaHCO₃ (0.1M) によりpH8.5に調整

BPX: ポテスターチ 100g/l
パーレーフラワー 50g/l
BAN5000SKB 0.1g/l
カゼイン酸ナトリウム 10g/l
ダイズ食品 20g/l
Na₂HPO₄ · 12H₂O 9g/l
ブルロニック 0.1g/l
LBアガー: バクトトリプトン 10g/l
バクト酵母抽出物 5g/l
NaCl 10g/l
バクトアガー 15g/l
NaOHによりpH7.5に調整

一般方法

プラスミドを作製するために用いる実験技術は組換えDN

伝子は12.8kbのEcoRIフラグメント上において、E. コリプラスミドpBR322の中にクローンされている (Starnesら, 1989)。この制限地図は図22に示す。

株

E. コリ SJ6: MC1000の制限欠失誘導体 (Diderichsenら, 1990)。

バチルス スブチリス DN1885: B. スブチリスの amyE, amyR, spo⁺, Pro⁺ 誘導体 (Diderichsenら, 1990)。

バチルス スブチリス DN1686: dal遺伝子において染色体欠損を含むDN1280の spo⁻ 誘導体。

バチルス リシエニホーミス ATCC9789

バチルス レンタス NCIB10309

培地:

TY: トリブチカーゼ 20g/l
酵母抽出物 5g/l
FeCl₂ · 4H₂O 6mg/l
MnCl₂ · 4H₂O 1mg/l
MgSO₄ · 7H₂O 15mg/l
pH 7.3
TY9: TY培地と同じであるが、但しpHをNaH

A技術の分野における標準的な技術であった。参考文献、T. Maniatisらの Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1982。

制限エンドスクレアーゼをNew England Biolabs及びBoehringer Mannheimより購入し、この製造業者により推奨される通りに使用した。T4 DNAリガーゼはNew England Biolabsより購入し、そしてこの製造業者により推奨される通りに使用した。

全ての株からのプラスミドDNAの調製はKieser, 1984に詳細の方法によって行った。

E. コリの形質転換:

E. コリの細胞をコンピテントにし、そしてMandelとHiga, 1970に詳細の通りに形質転換せしめるか、又はBIO-RADジーンパルサー (Gene Pulser) エレクトロポレーション装置に関する仕様書において詳細の通りにエレクトロポレーションによって形質転換せしめた。

B. スブチリスの形質転換:

コンピテント細胞を調製し、そしてYasbinら, 1975に詳細の通りに形質転換せしめた。

B. リシエニホーミスの形質転換:

プラスミドをB. リシエニホーミスの中に、Akamatsu, 1984に詳細の通りにポリエチレングリコール中介プロトプラスト形質転換によって導入せしめた。

B. レンタスの形質転換

プラスミドをB. レンタスの中に、Akamatsu (1984) による方法を若干改良した方法に従ってプロトプラスト形質転換によって導入せしめた。この改良は、再生培地における高めのpHである。例えばHCP1、5培地を、この培地に0.1MのNaHCO₃を加えることによりpH8.5に緩衝化せしめた。

実施例1

バチルスレンタス染色体における非複製型DNA分子の安定な組込み

スブチリシン309の遺伝子のクローニング

スブチリシン309と命名されているプロテアーゼをコードする遺伝子を、wo89/06279に詳細の通り、B. レンタス株NCIB10309の単離体からクローン化した。更なるサブクローニングは、pUB110の複製起点、pC194由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子(cat)、2つのプロモーターP_{sub} M及びP_{sub} Q並びにスブチリシン309プロテアーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドpSX120をもたらした。(図4及び国際特許出願PCT/DK90/00164号を参照のこと)

組込みプラスミドpPL2002の作製

pUC19 (Yanisch-Perronら)をEcoRIにより制限せしめ、そして以下のオリゴヌクレオチド配列 (BeaucageとCaruthers, Tetrahedron letters 22, 1981,

afaneら、1987)を含んで成るpE194 DNAフラグメントを含む。

pPL1975 (図3)をEcoRI及びBamHIにより制限化せしめ、そしてこの直鎖状のプラスミドを、スブチリシン309遺伝子及びcat耐性遺伝子を含む、pSX120 (図4)由来の3.3kbのEcoRI (部分的)、BglIIフラグメントにリゲートせしめることにより、プラスミドpPL2002 (図5)を作製した。このリゲーション混合物を次にコンピテントE. コリスJ6細胞の形質転換のために用い、そして100 µg/mlのアンピシリンを含むLBプレート上でこの形質転換体を選別した。

B. レンタスの染色体へのpPL2002プラスミドの安定な組込み

B. レンタス株NCIB10309の単離体を、温度感受性プラスミドpE194 (図1参照)によるプロトプラスト形質転換により形質転換せしめ、30℃ (許容温度)でエリスロマイシン耐性 (5 µg/ml) について選別した。得られる株をPL2156と命名した。

次にPL2156をプラスミドpPL2002によりプロトプラスト形質転換せしめ、30℃にてクロラムフェニコール耐性 (8 µg/ml) 及びエリスロマイシン耐性 (5 µg/ml) について選別し、2種類のプラスミドpE194及びpPL2002を含む株PL2157が得られた。これらの細胞において、プラスミドpPL2002の複製は、pPL2002複製に必須なる複製タンパク質repFをコードする

頁1859-1869により詳細のホスホアミダイト法により、自動DNA合成装置において調製)

AATTGATCAAGCTTTAAATGCATGCTAGCAACGCCGCCCAACCTCGAGATCTCATG
CTAGTTCCGAAATTTACGTACGATCGTTGCGCGCGCGTTGGAGCTCTAGAGTAC
TTAA

を直鎖状のpUC19の中に挿入せしめ、その後リゲーションを行うことにより、プラスミドpDN3000を作製した。このリゲーション混合物を次にコンピテントE. コリスJ6細胞を形質転換せしめるために用い、そして100 µg/mlのアンピシリンを含むLBプレート上で形質転換体を選別した。pDN3000に挿入されたリンカーの方向性は図1における制限部位の方向により示した通りである。

BglIIによってpDN3000を制限化せしめ、その後のこの直鎖状のプラスミドとpE194 (図2、HorinouchiとWeisblum)のMboIによる制限化により得られる位置1から1585迄のDNAを含むMboIフラグメントとのリゲーションにより、プラスミドpPL1975を作製した。このリゲーション混合物を次にコンピテントE. コリスJ6細胞を形質転換せしめるために用い、100 µg/mlのアンピシリンを含むLBプレート上で形質転換体を選別した。これら2つのフラグメントの連結の方向は図3に示す通りである。従ってpPL1975は機能的なE. コリ複製起点、並びに完全なプラス起点 (+ori pE194) 及び不完全repF遺伝子 (repF') (Villi

プラスミドpE194の存在に完全に依存した。

株PL2157をTY9培地中でオーバーナイト増殖させ、そしてその希釈物を45℃ (非許容温度)でTY9プレート上において平板培養し、クロラムフェニコール耐性 (10 µg/ml) について選別した。

これらのクロラムフェニコール耐性コロニーのうちの1つをPL2158と命名した。

サザンハイブリダイゼーションは、株PL2158においてプラスミドpPL2002がこの受け入れられるプラスミドと染色体スブチリシン309遺伝子との間の相同性組換えによってその染色体の中に組込まれ、そしてその後約4コピーに増幅されることを示した。完全なpE194プラスミド配列の形跡は全く検出されなかった。

染色体的に組込んだ株PL2158におけるpPL2002のコピーの安定性を、抗生物質を全く用いないで大量スケール発酵 (1500 l) において試験した。

発酵後、サンプルを希釈し、そしてTY9プレート上で平板培養し、10 µg/mlのクロラムフェニコールを含むTY9プレートに100個のコロニーをレプリケートさせた。試験コロニーのうちの98個が未だクロラムフェニコールに耐性であり、プラスミドpPL2002がまだこの染色体に組込まれていることを示唆する。これらのコロニーのうちの20個を次にサザンハイブリダイゼーションにより試験し、試験したコロニーの全てにおいて、明らかに同じコピー数 (約4コピー) でプラスミドpPL2002が未だ組込まれてい

ることが示された。

実施例2

2つのpUB110複製起点を含むプラスミドベクターの

作製

プラスミドpSJ1085 (図7) を、BamHI及びEcoRIによりpDN3060 (これはpUB110に由来する複製起点 (+ori pUB110) 及びrep遺伝子 (rep)、並びにpC194に由来するクロラムフェニコール耐性遺伝子 (cat) を含む) を制限化し、そして以下のオリゴヌクレオチド配列 (BeaucageとCaruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, 頁1859-1869に詳細のホスホアミダイト方法により、自動DNA合成装置において調製) AATTCTGCAGATATCAAGATAAGAAACAAGTTCCG

GACGCTCTATAGTTCTATTCTTTCTTGTTCAGGCCTAG

をこの直鎖状pDN3060の中に挿入せしめることにより作製し、その後リゲーション及びB. スプチリスDN1885への形質転換を行った。

プラスミドpSJ1103 (図9) を、EcoRIによりpSJ1085 (図7) を制限化せしめ、そしてこの直鎖状プラスミド全体を、同様に制限化せしめたプラスミドpUC19 (図8) の中に挿入せしめることにより作製し、その後リゲーション及びE. コリSJ6への形質転換を行った。得られるプラスミドpSJ1103はpUB110由来のプラスミド起点及びrep遺伝子、pC194由来のcat遺伝子、

において挿入せしめた。その後のE. コリSJ6への形質転換によりpSJ1155 (図14) 及びpSJ1157 (図15) のそれぞれが得られた。pSJ1157はkan遺伝子を2つの直列コピーにおいて含んだ。1方のコピーをBamHIにより切り出し、そしてこの6.5kbのフラグメントを再リゲートし、そしてE. コリSJ6に形質転換せしめ、pSJ1259を形成せしめた (図16)。

プラスミドpSJ1139 (図18) は以下の通りに作製した: クロラムフェニコール耐性遺伝子 (cat)、カナマイシン耐性遺伝子 (kan) 及び関連のrep遺伝子を伴うpUB110プラスミドを含むパチルスプラスミドpDN2904 (図17) をSphIにより消化し、そして既にSphIにより消化せしめたpSJ1130 (図10) にリゲートせしめた。得られるプラスミドpSJ1139は不完全rep遺伝子に連結しているpUB110起点及び完全rep遺伝子に連結しているpUB110起点を含んでいた。

実施例3

パチルススプチリスにおける2つのpUB110複製起点を含むプラスミドからの子孫DNAベクターの形成

プラスミドpSJ1139 (図18) (本質的に周知の方法においてE. コリSJ1139より調製) をカナマイシン耐性 (10 µg/ml) の選別のためにB. スプチリスDN1885に形質転換せしめた。プラスミドDNAは複数の形質転換体より調製された。これらのプラスミドのアガロースゲル電気泳動 (種々の制限酵素により消化して) がい

pUC19複製起点 (ori pUC19) 並びにβ-ラクタマーゼ (アンピシリン耐性) 遺伝子 (bla) を含む。

プラスミドpSJ1130 (図10) はpSJ1103 (図9) に由来し、1.6kbのNsiI-PstIフラグメントを削除することにより、pUB110プラスミド起点及び不完全rep遺伝子 (rep') を含むpUC19プラスミドが本質的に得られる。このプラスミドをE. コリSJ6に形質転換せしめた。

プラスミドとその後に続く完全rep遺伝子を含むpDN3060 (図6) 由来の1.4kbのHindIIIフラグメントを次にpSJ1130 (図10) の固有HindIII部位に挿入せしめ、そしてこのリゲートせしめたプラスミドをE. コリSJ6の中に形質転換せしめ、pSJ1136が得られた (図11)。この実験において、このフラグメントは2つの直列コピーにおいてpSJ1136の中に挿入された。その後これらのコピーのうちの1つをNsiIによるpSJ1136の消化によって除去し、5.1kbのフラグメントの再リゲーション及びE. コリSJ6の形質転換を行い、不完全rep遺伝子と並んだ1つのpUB110起点及び完全rep遺伝子と並んだ1つのpUP110起点を含むpSJ1137 (図12) が得られた。

カナマイシン耐性をコードする遺伝子 (kan) を1.4kbのSphIフラグメント上においてプラスミドpPL1484 (図13) から切り出し、そしてpSJ1137のSphI部位 (図12) の中に2つの考えられる方向性それぞれ

まいが) は、5.1kb及び2.4kbのそれぞれの小さなDNA分子の存在並びに少量の7.5kbの全長プラスミドpSJ1139の存在を示した。得られる制限パターンは、pSJ1139上の2つのrep配列間の相溶性交差によるか、又はA. GrussとS. D. Erlich (前記) に詳細の通り、後に追いつかれ、そして再循環化されるプラスミド鎖におけるpUB110プラスミド起点にてニックを生じせしめるRepタンパク質の作用のいずれかによる、予測される2種類の子孫ベクターpSJ1139a (図19) 及びpSJ1139b (図20) の形成に関するものであった (これらのメカニズムは両者とも同じ2種類の子孫ベクターをもたらす)。

これらのベクターをB. スプチリス株DN1885に再形質転換せしめ、そして10 µg/mlのカナマイシン又は6 µg/mlのクロラムフェニコールのいずれかを含むLBプレート上で平板培養し、その後各プレートのレプリカを他の抗生物質を含む新たなプレート上に平板培養せしめることにより更に分析した。次いでベクターを各タイプの形質転換体から単離し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析し、以降の結果を得た:

クロラムフェニコール及びカナマイシン両者に耐性な形質転換体は3種類の全てのベクター片を含んでいた (7.5kbのpSJ1139, 2.4kbのpSJ1139a及び5.1kbのpSJ1139b)。クロラムフェニコールに耐性且つカナマイシンに感受性の形質転換体はpSJ1139bのみ

を含んでいた。カナマイシンには耐性であるがクロラムフェニコールに感受性の形質転換体は得られなかった。2.4 kbの小さな子孫ベクターpS J 1139 aは従ってB. スプチリスにおいて自立的に複製できなかった。

実施例4

B. スプチリス染色体における非複製型DNA分子の安定な組込み

シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ (CGTase) 遺伝子の2つの染色体コピーを含むB. スプチリス株の作製

CTGase遺伝子 (CGT) を2.5 kbのBamHI-SphIフラグメント上においてプラスミドpPL1878 (図22) から切り出し、そしてBamHI-SphI消化プラスミドpDN3020 (図21) にリゲートせしめてプラスミドpPL1896 (図23) を形成せしめた。pDN3020はpDN1313 (Diderichsen, 1986) の誘導体であり、合成SphI含有オリゴヌクレオチドリンカー (前記の実施例1の通りに調製) をプラスミドpDN1380 (DiderichsenとChristiansen, 1988) のEcoRI部位に挿入せしめてプラスミドpDN1620を得ることにより作製される。pDN1620 (B. DiderichsenとL. Christiansen; 前記) 上に存在するB. ステアロサーモフィルス由来のマルトジェニック (maltogenic) アミラーゼ (PamYM) からのプロモーター領域を次に約

200bpのBamHI-SphIフラグメント上においてSphI-BamHI消化pUC19に導入し、プラスミドpDN2977を得た。このプロモーター領域を約200bpのBglII-SacIフラグメント上においてpDN2977から切り出し、これをpDN1313のボクリンカー領域に挿入せしめ、これによってプラスミドpDN3020を作り上げた。pPL1896上のCTGase遺伝子は図23に示すdal及びdfsとして示すB. スプチリス染色体DNAの2本のフラグメントと隣り合っている。dalはB. スプチリスのD, L-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子である (Diderichsen 1986)。

プラスミドpPL1896をB. スプチリス株DN1686に形質転換せしめた。Dal⁺形質転換体について単に選別した場合、クロラムフェニコール感受性CGTase⁺である複数の株が得られた。これらはDiderichsen, 1986に詳細の通りのpPL1896とDN1686染色体の二重相同性交差反応により形成される。このような株の1つはCGTase遺伝子の染色体に組込まれたコピーを含むpL1897である。

CGTase遺伝子を含む組込みベクターの作製

CGTaseを2.5 kbのBamHI-NotIフラグメント上においてpPL1878 (図22) から切り出した。発現ベクターは、常用の突然変異誘発処理により得られるB. リジェニホーミスATCC9789のアミラーゼ過剰生産誘導体よりクローン化したアルファアミラーゼ遺伝子のプロ

モーター領域を含む0.6 kbのSphI-PstIフラグメントを、pUB110起点及びカナマイシン耐性をコードする遺伝子を含むpUB110由来のベクターに挿入せしめることにより作製した。このCGTase遺伝子 (cgl) をBamHIとNotI部位の間でこのプロモーターの下流に挿入せしめ、pS J 993が得られた (図24)。

pS J 993由来の4 kbのBglIIフラグメントをpS J 1155 (前記の実施例1に詳細; 図14) のBglII部位に挿入せしめ、得られるプラスミドをE. コリ株S J 6に形質転換せしめ、アンピシリン耐性のE. コリ株S J 6のCGTase生産形質転換体を、100 µg/mlのアンピシリン及び0.5%の可溶性デンプンを含むLBプレート上で形質転換体を平板培養することにより単離し、ヨウ素蒸気によるプレートの染色の後でのコロニーのまわりでの透明な円の形成についてスクリーンした。カナマイシン耐性遺伝子が再生されているプラスミドpS J 1163 (図25) を保有する形質転換体を更なる実験のために保存した。B. スプチリス株DN1885及びpL1897におけるpS J 1163由来の子孫ベクターの形成

pS J 1163 (図25) をDN1885に形質転換せしめ、そしてベクターDNAをカナマイシン耐性形質転換体から調製してアガロースゲル電気泳動によって分析した。これはpS J 1163に相当する微量の10.5 kbのプラスミド分子を示し、更におよそ等量且つ大量において4.1 kbのpS J 1163 b (図27) 及び6.4 kbのpS J 1163 a

の2種類の子孫ベクター分子のそれぞれが示された。これらはpS J 1163の2つのrep配列間の相同性組換え又は前記したローリングサークル複製における各プラス起点でのRepタンパク質の作用のいずれかにより得られる子孫ベクターに相当する。上記のこの子孫ベクターの形成はpS J 1163をpL1897に形質転換せしめた場合も見られ、そしてこのような2種類の形質転換体をS J 1168及びS J 1170として更なる実験のために保存した。

非複製型DNA分子を含む組込み体の単離

株S J 1168及びS J 1170を5 µg/mlのカナマイシンを含む10 mlのTY培地に植え付け、そして37°Cでオーバーナイトインキュベートした。次いで各培養物100 µlを新鮮なTY培地に植え付け、そしてインキュベーションを繰り返した。このようなオーバーナイトインキュベーションを4回繰り返した後、この2種類の培養物からプラスミドDNAを調製し、そしてアガロースゲル電気泳動により分析した。プラスミド分子は見られなかった。アンピシリン耐性についてのE. コリ選別のために形質転換させるようこのプラスミド調製物を利用した場合は形質転換体は得られず、もとの10.5 kbのpS J 1163又は4.1 kbの子孫ベクター分子pS J 1163 bのいずれもが存在していないことを示唆した。カナマイシン耐性の無プラスミド株をS J 1223及びS J 1237として更なる実験のために保存した。

組込まれたDNAの増幅

徐々に増加するカナマイシン濃度を有するTY培地中での

均増殖を選択することにより、20、50、100、200、400、600、800、1000、1200、および1400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシン中で増殖できる株を単離した。上記の約400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンに抵抗性の株から染色DNAにおいて、NheI又はNotIによる消化により、これらの酵素による6、4 kb子孫ベクターpSJ1163aの消化から期待される大きさのDNA帯が認められた。この帯は、より少ない程度のカナマイシン抵抗性を有する株から複製されるDNAの消化中には現われなかった。控え目に予測すると、組込まれたDNAの少なくとも5~10個のコピーがこの帯が現われると存在するであろう。

組込まれたDNAの安定性

400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンに抵抗する株を、カナマイシンを添加することなくBPX培地含有瓶とうフラスコ中37℃で1時間増殖させた。次いでそれらをLBプレート上に塗布し、引き続き10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含有するプレート上にレプリカ培養した。約100個のコロニーについて、全てカナマイシン抵抗性であり、選択圧の非存在下、組込まれたDNAに関し存在するカナマイシン抵抗性遺伝子の安定な遺伝性を示した。

B. スブチリスにおけるプラスミド産生CGTアーゼ遺伝子の安定性

プラスミドpP11892は、pSG993 (図24) と本質的に同一であり、唯一の差異は、異なるポリリンカー領域がCGTアーゼ遺伝子の下流に存在する。このプラスミド

は、DN1885に取入され、得られた株SJ984を、カナマイシン添加することなく、BPX培地を含有する瓶とうフラスコ中で37℃で1週間増殖させた。カナマイシン含有プレート(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)上に塗布し、カナマイシンを有しないプレートよりも10倍少ない細胞数を得、90%の細胞がそれらのプラスミドを失っていたことが示される。このことは又、カナマイシンを有しないプレート上のコロニーの10%未満がCGTアーゼを生産した。

実施例5

B. リケニホルミスATCC9789中、pSJ1156からプロゲニベクターの形成

プラスミドpSJ1156は、図15に示すpSG1157と同一である。pSG1156はプロトプラスト形質転換によりB. リケニホルミスATCC9789に取入し、カナマイシン抵抗性を選択し、株SJ1199を得た。制限酵素の消化およびアガロースゲル電気泳動によるSJ1199のプラスミド含量の分析により、2個のプラスミド分子の存在が明らかになった。一方でプラスミド分子は、pSJ1259 (図16) に同一であり、相同性組換えによりkan遺伝子の一つのコピーの欠損により殆ど同様に形成された。他のプラスミド分子はpSJ1259a (図28) に相当し、pSJ1259の2個のrep配列間での相同性組換え、又は上記の如くローリングサークル複製における各プラス起点でRep蛋白質の作用により形成されうる2個の子孫分子の一方である。

実施例6

B. リケニホルミスATCC9789染色体中の非複製型DNA分子の安定な組込み

組込みベクターの構築

プラスミドpSG1260は、図16に示すpSG1259と同一である。B. リケニホルミスATCC9789からの染色体DNAを、PstIおよびBamHIで消化し、次いで2 kbおよび4 kb間のフラグメントをアガロースゲルから単離した。これらのフラグメントを、PstIおよびBamHIで消化したpSJ1260に結合せしめ、次いで選択的アンピシリン抵抗性を有するE. コリーSJ6に形質転換した。得られた1つの形質転換体は、2、1 kbの挿入断片を有し、更にプラスミドはpSJ1555 (図29) を示した。E. コリーSJ6含有pSJ1555を、ナショナルコレクション オブ インダストリアル アンド マリーネ バクテリア (英国、スコットランド、AB2 1RY、マーチャードライブストリート) に、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に従って1990年12月12日に寄託し、寄託番号NCIMB40346を得た。このプラスミドは、2個の子孫分子pSJ1555a (図30) およびpSG1555b (図31) を形成する能力を有している。

非複製型DNA分子を含有するB. リケニホルミス組込み体の単離

pSJ1555を、プラスミド形質転換によりB. リケニ

ホルミスATCC9789に取入し、カナマイシン抵抗性に対し選択した。1種の再生のカナマイシン抵抗性形質転換体(SJ1613)を該形質転換体からのプラスミド調製品のゲル電気泳動に示される如くプラスミドを有さず、プラスミド調製品はB. スブチリスをカナマイシン抵抗性に形質転換できなかった。

組換えDNAの増幅

株SJ1613を、10、20、50、100、200、400、600、800、1000、1500、2000、2500、3000、4000および5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でカナマイシンを含有する、10 mlの連続的なTY培地中で増殖せしめ、次いでこれらの種々の濃度の各々で増殖する株を更に研究するために保持した。20、200、および1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンに抵抗する株を更に分析した。2種の後者の株から得た染色体DNAは、染色体中で組込まれたpSJ1555aの多数のコピーを含有する株に対し期待される如く、第一の株のDNAは存在せず、BamHIで消化して4、5 kbの明確な帯を示した。全ての株を、カナマイシンなしでBPX瓶とうフラスコ中、37℃で7日間増殖せしめ、次いでLBプレート上に画線した。LBプレートからカナマイシンプレート(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)にレプリカプレートすると、カナマイシン感受性コロニーは現われなかった。カナマイシン(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)と共に、およびカナマイシンを有しないプレート上の集落数を、20、200および1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンに抵抗する3種の株に対して得、さ

らにそれらは全ての場合 10^{-10} ml^{-1} であり、超込まれた *kan* 遺伝子の安定性を示した。

文献

アカマツ, T., セキグチ, J. (1984), バシラス種に対するプロトプラスト再生の改良方法およびそのプロトプラスト融合および形質転換に対する応用, *Agric. Biol. Chem.*, 48, 651~655.

ヤニシャーベロン, C., バイラ, J., メッシング, J. (1985), 改良された M13 ファージクローニングベクターおよび宿主株: Nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene*, 33, 103-119.

デイデリシェン, B. (1986), バシラス スズブチリン中のクローン化遺伝子の安定化に対する遺伝系, In *Bacillus Molecular Genetics and Biotechnology Applications*, ガネサン, A. T. およびヘッシュ, J. A. Eds., 35~46 頁, アテデミックプレス.

デイデリシェン, B., クリスチアンセン, L. (1988), バシラス ステアロサーモフィラス由来のマルトース産生 α -アミラーゼのクローン化, *FEMS Microbiology Letters*, 56, 53-60.

ジデリシエン, B., ウェデステッド, U., ヘデガルト, L., ヤンセン, B. R., スジェホルム, C. (1990), *pld B* のクローン化, これは α -アクトロラクトレートデカルボキシラーゼ, バシララブレビス由来のエキソ酵素をコー

ドする, *J. Bacteriol.*, 172, 4315-4321.

グリクザン等 (1978), 形質転換によりバシラスズブチリンに導入されたスタフィロコッカスアウレウスプラスミドの特性, *J. Bacteriol.*, 134, 318~329.

マンデル, A., ヒガ, A. (1970), *J. Mol. Biol.*, 53, 159-162.

スターネス, R. L., トラックマン, P. C., カトコキン, D. M. (1989), 熱安定性シクロデキストリングリコシルトランフェラーゼ, その生産および使用, 国際特許出願, 公開番号wo89/3421.

セスピン, R. F., ウィリアムス, G. A., カンク, F. F. (1975), *J. Bacteriol.*, 121, 296-304.

R. ビラフェン, D. H. ベックホッフエル, C. S. ナラヤナンおよび D. ドブナウ, : プラスミド pE194 の再生制御遺伝子, *J. Bact.* (1987), 169, 4822-4829 頁.

S. ホリノウチおよび B. ワイスブラム: Nucleotide sequence and functional map of pE194 a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide lincosamide and Streptogramin type B antibiotics., *J. Bact.*, (1982), 804-814 頁.

キーゼル, T. (1984), ストレプトマイセス リビ

ダンスおよびエシリチカ ユリーから CCC DNA の単離に影響する因子, *Plasmid* 12, 19-36.

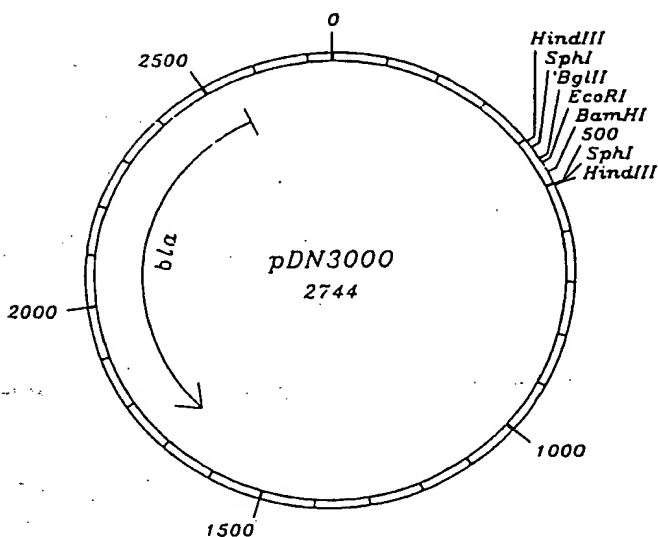


Fig. 1

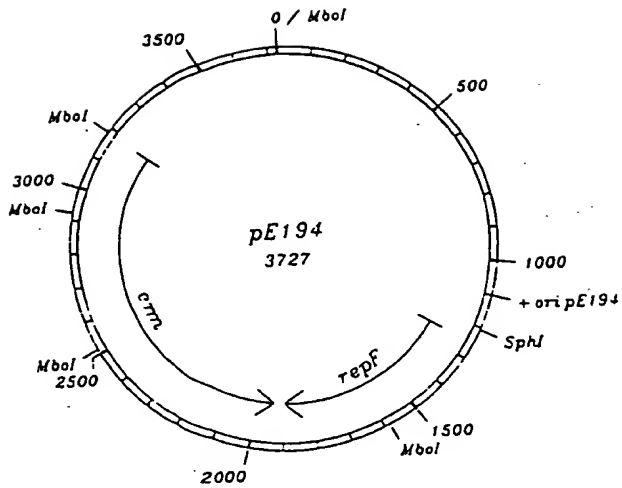


Fig. 2

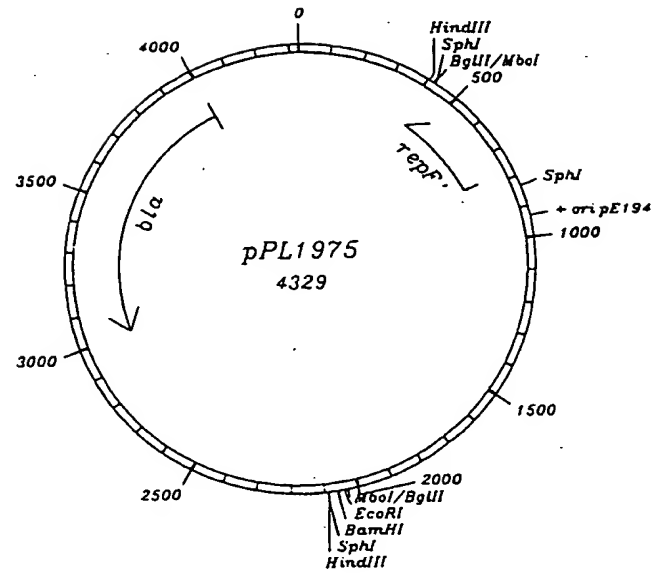


Fig. 3

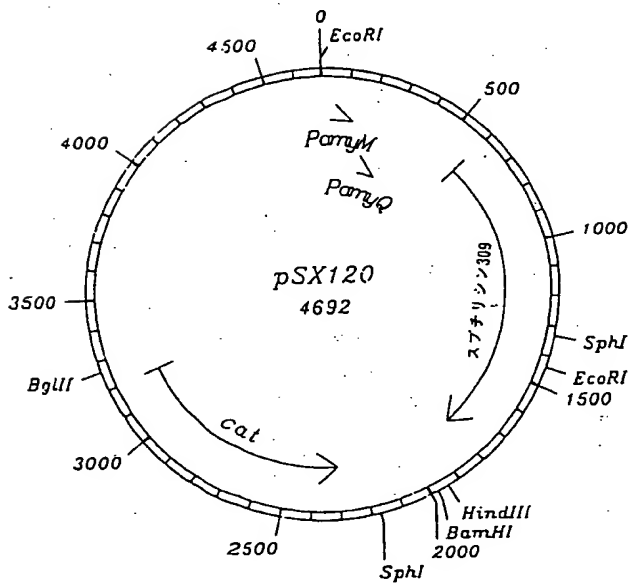


Fig. 4

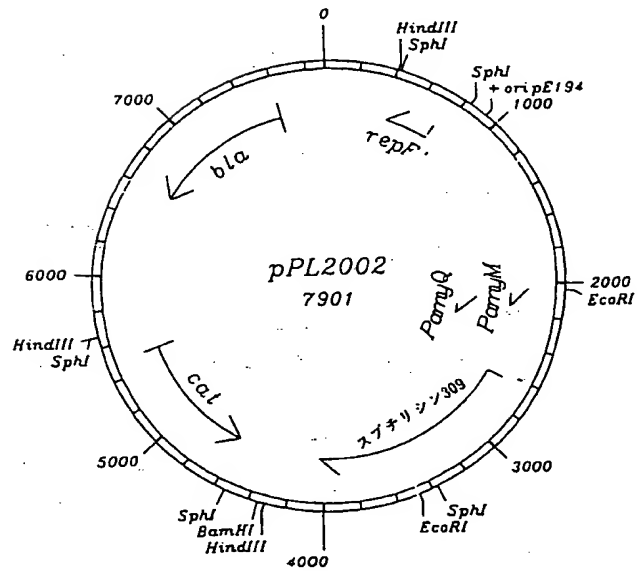


Fig. 5

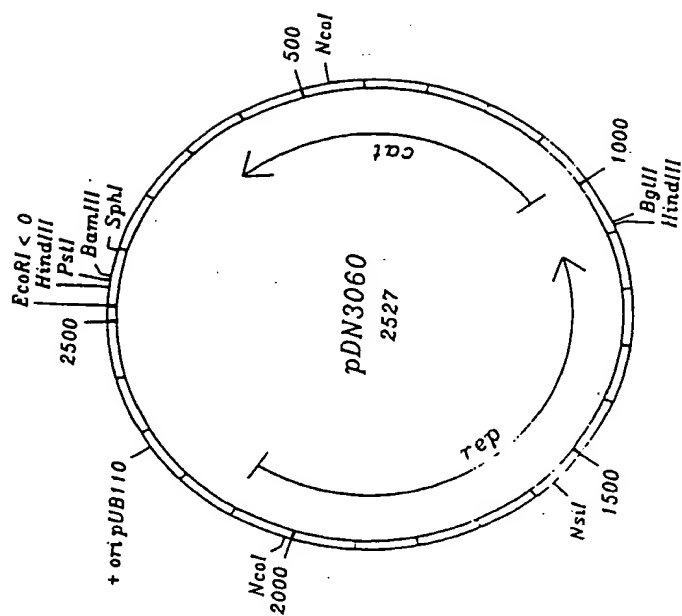


Fig. 6

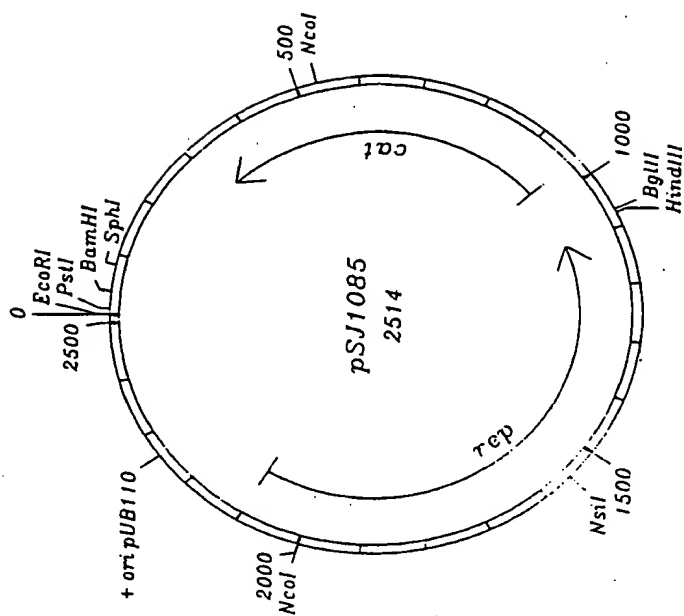


Fig. 7

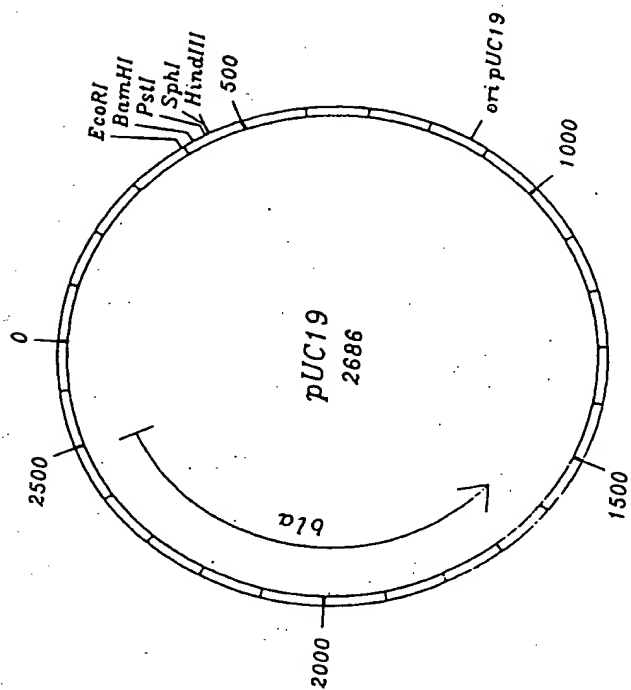


Fig. 8

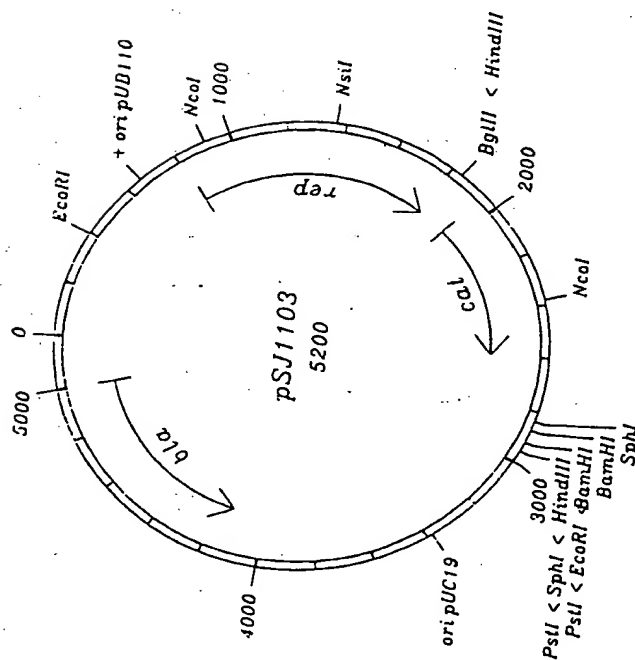


Fig. 9

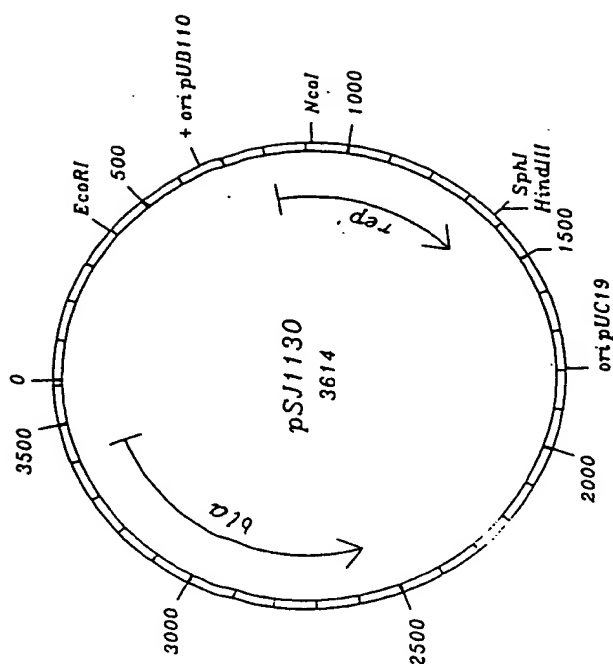


Fig. 10

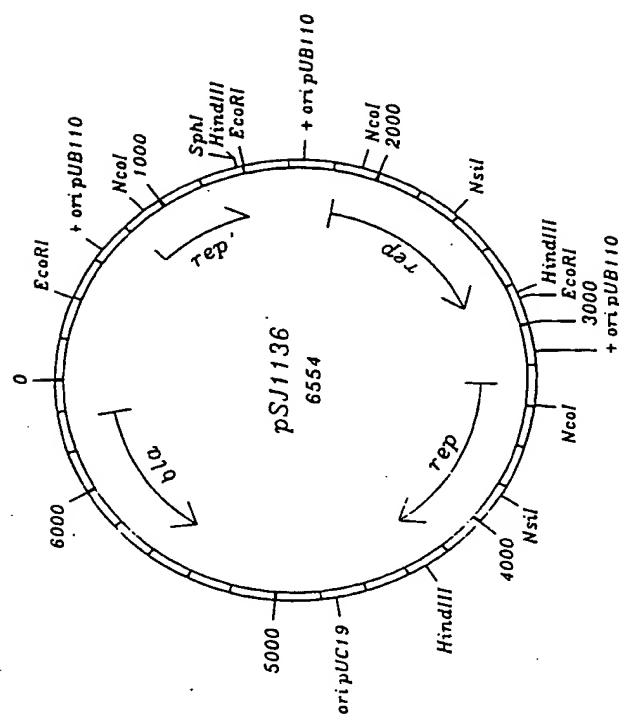


Fig. 11

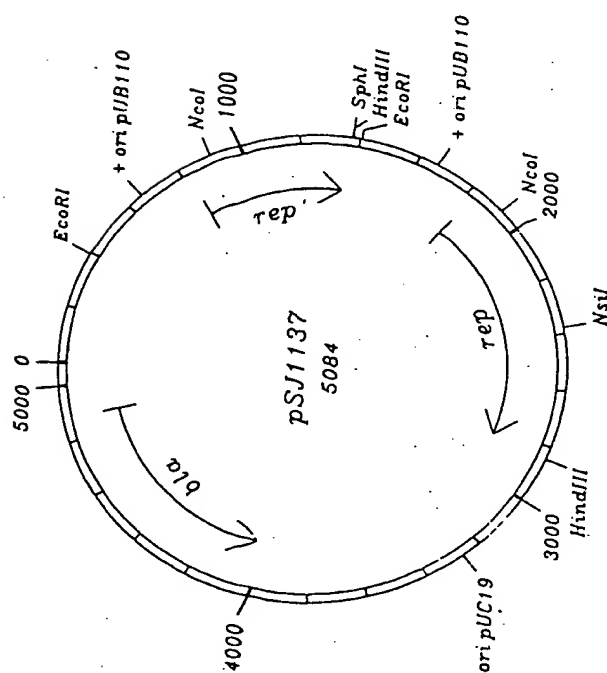


Fig. 12

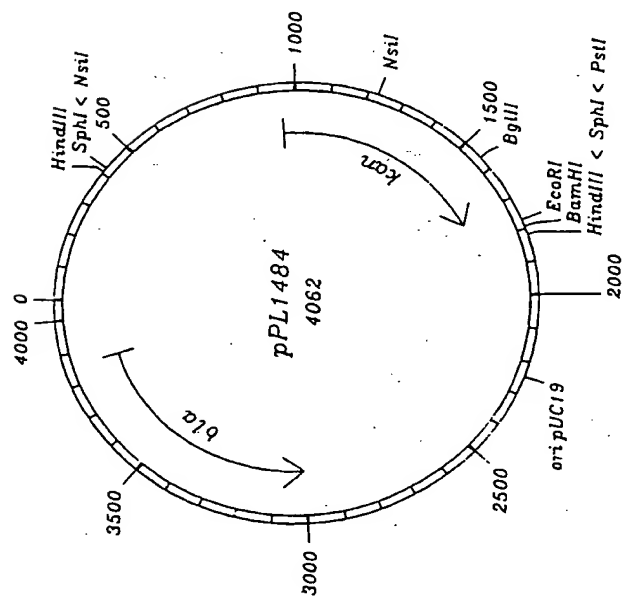


Fig. 13

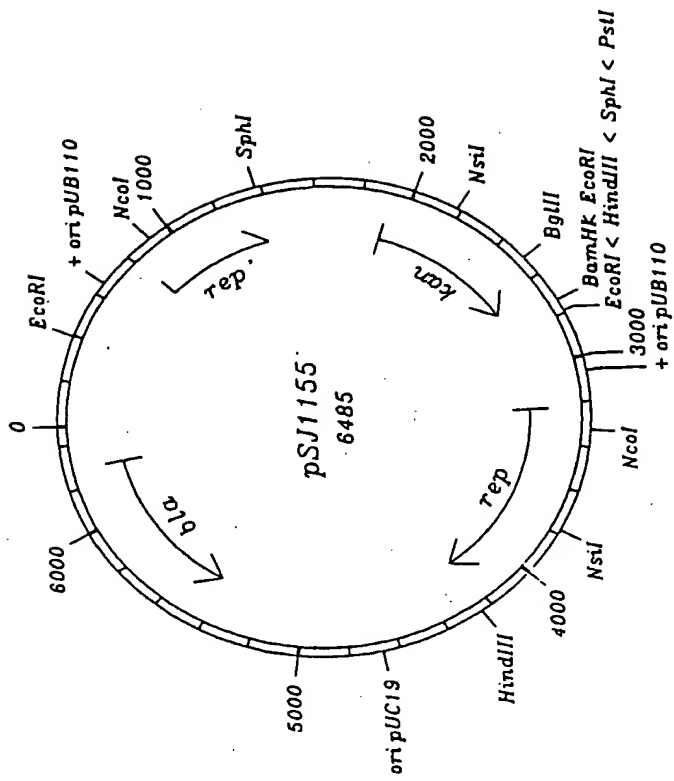


Fig. 14

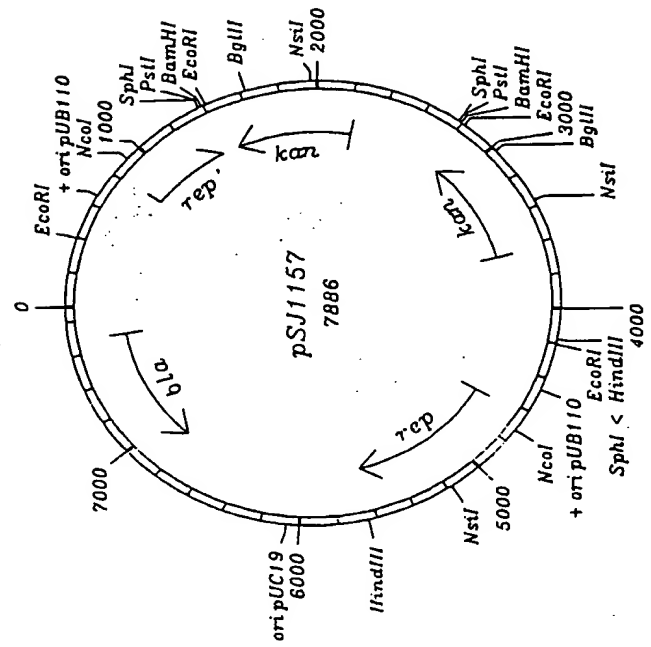


Fig. 15

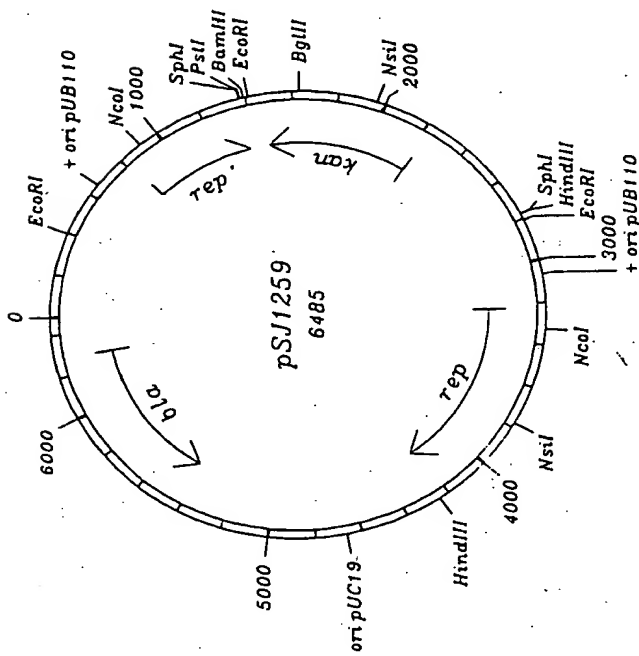


Fig. 16

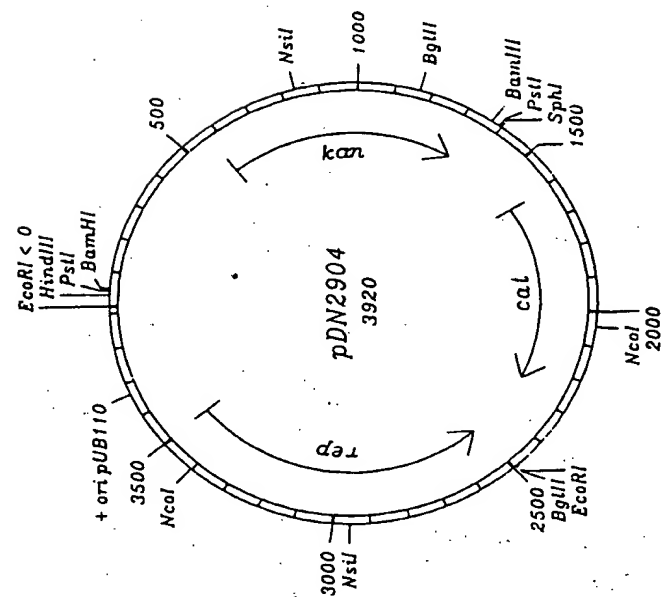


Fig. 17

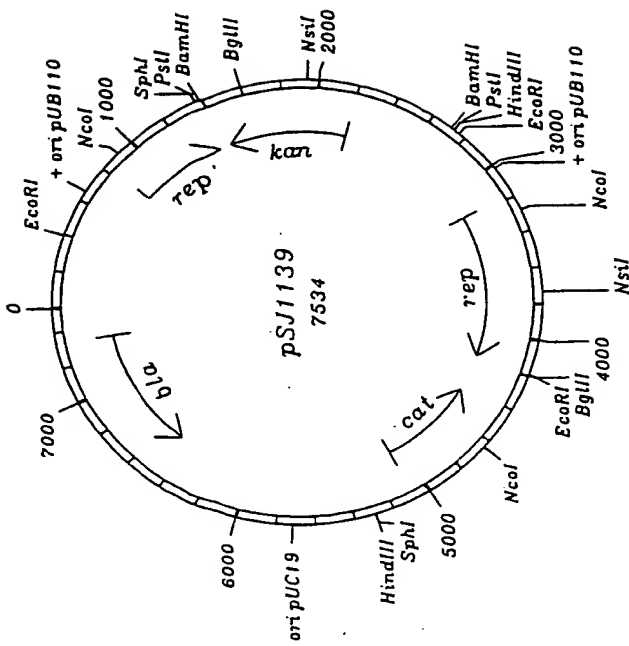


Fig. 18

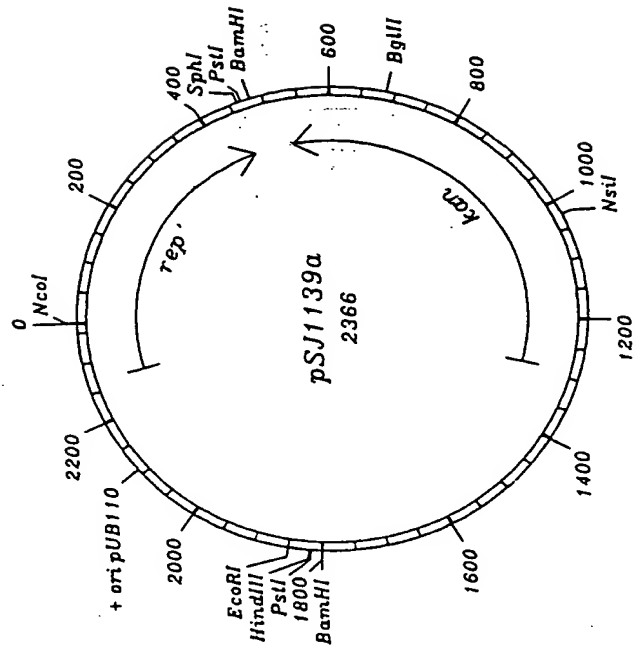


Fig. 19

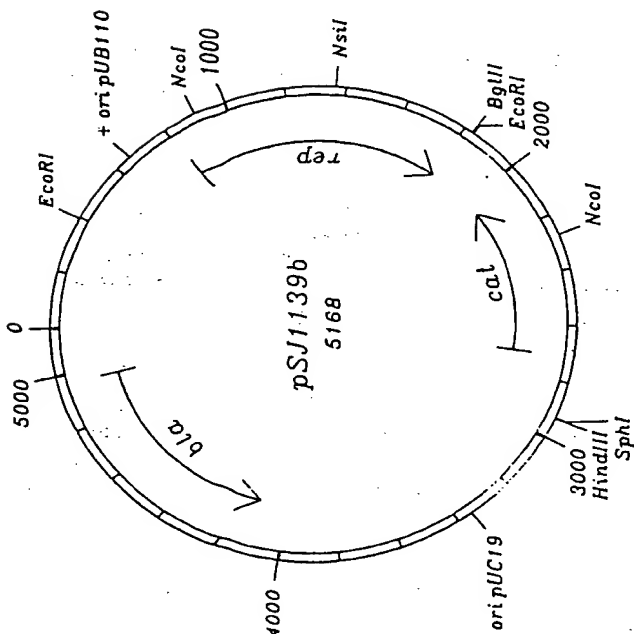


Fig. 20

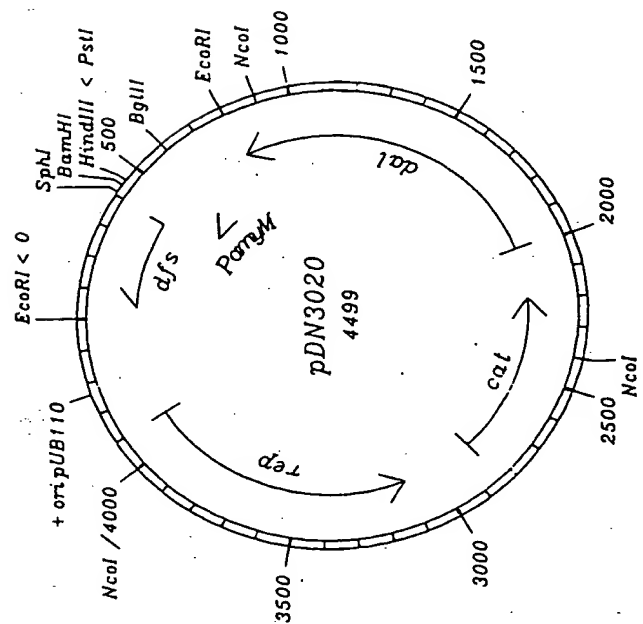


Fig. 21

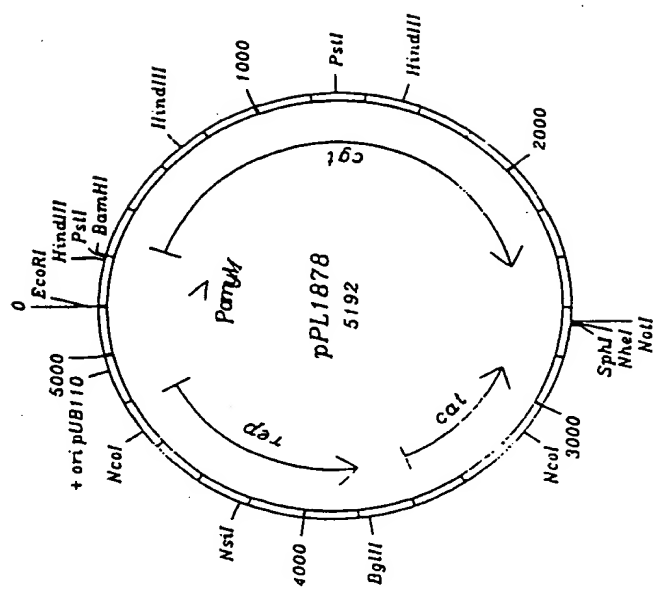


Fig. 22

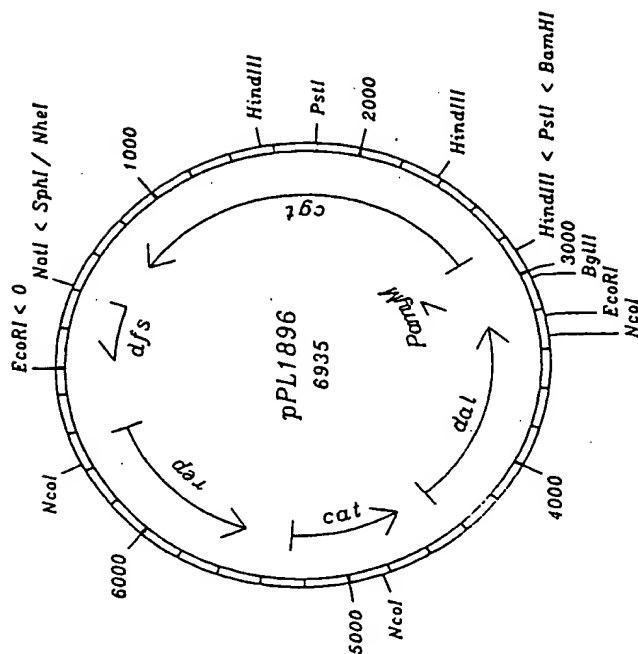


Fig. 23

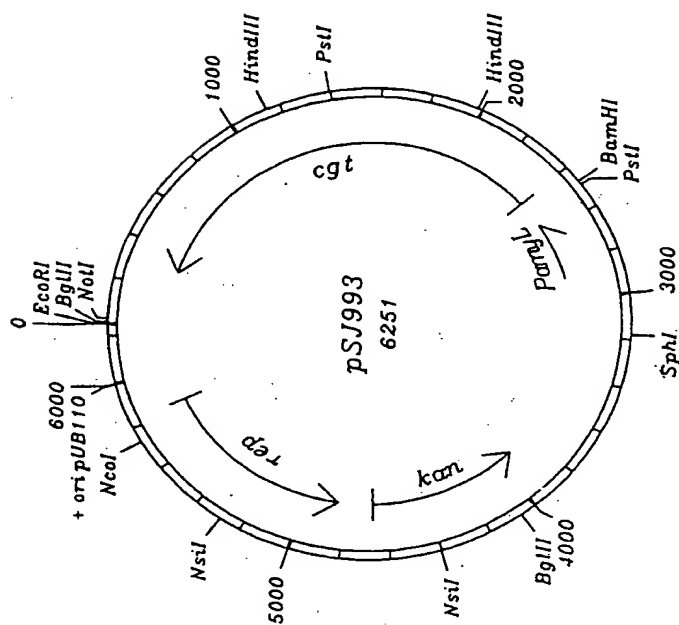


Fig. 24

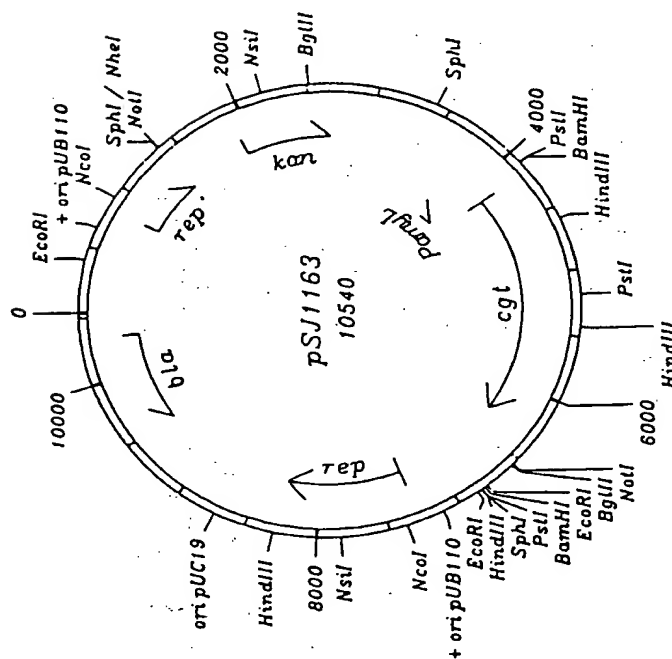


Fig. 25

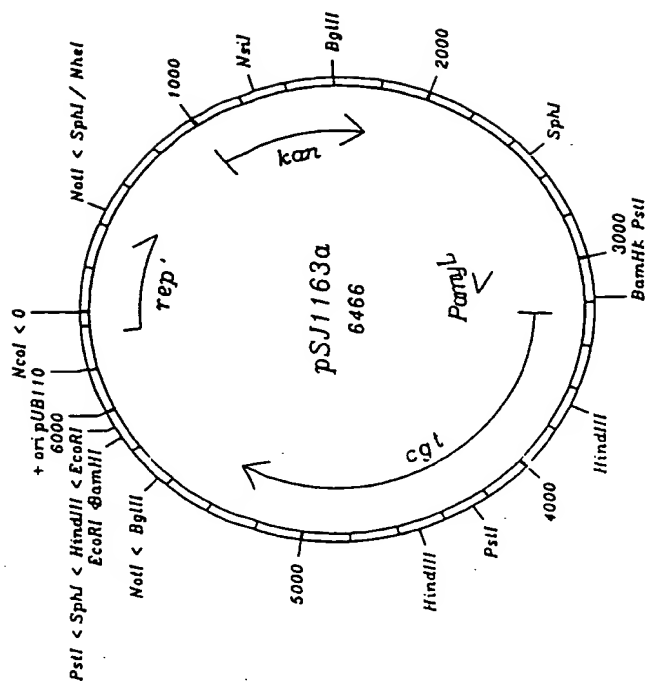


Fig. 26

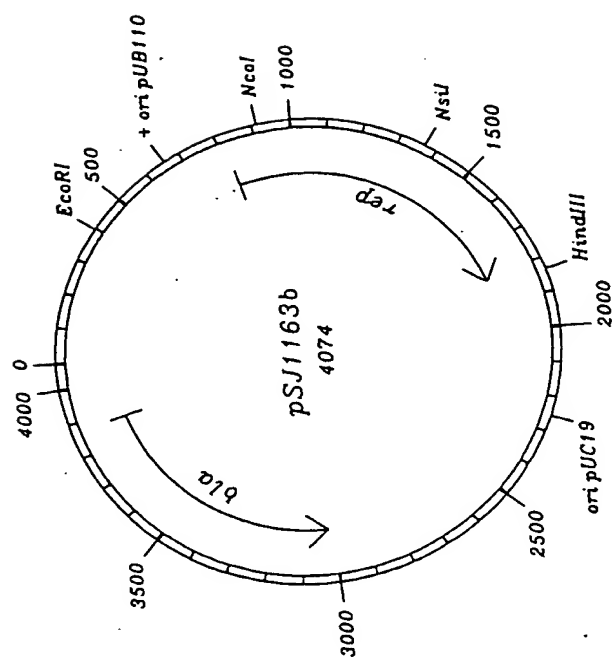


Fig. 27

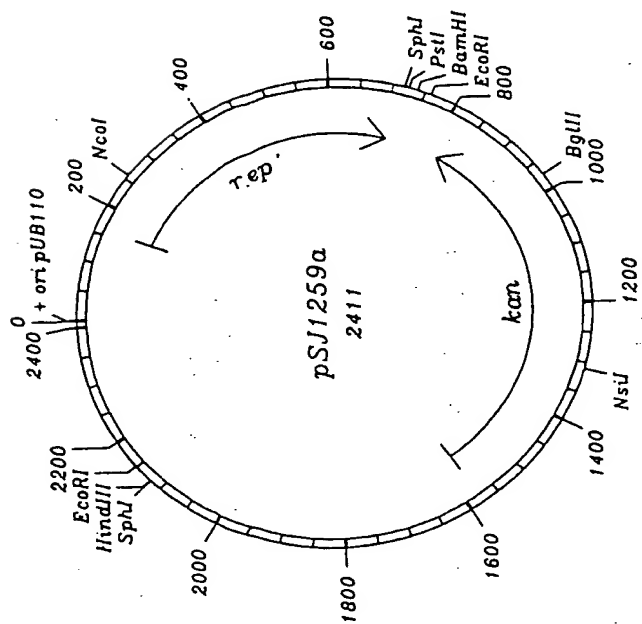


Fig. 28

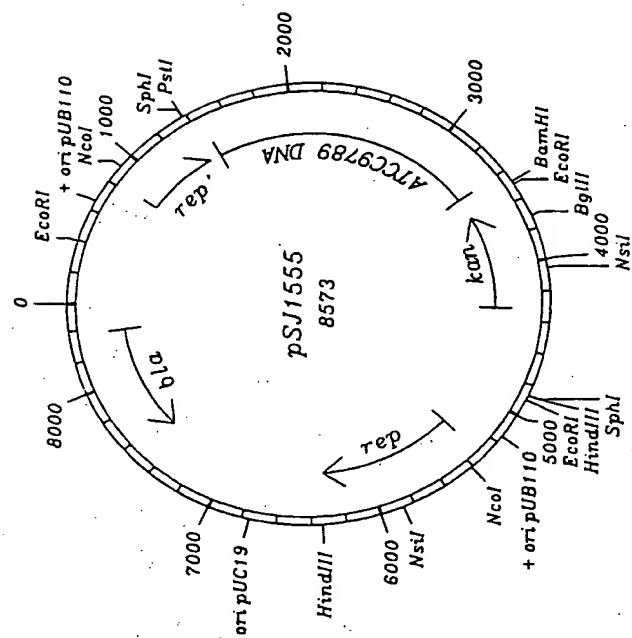


Fig. 29

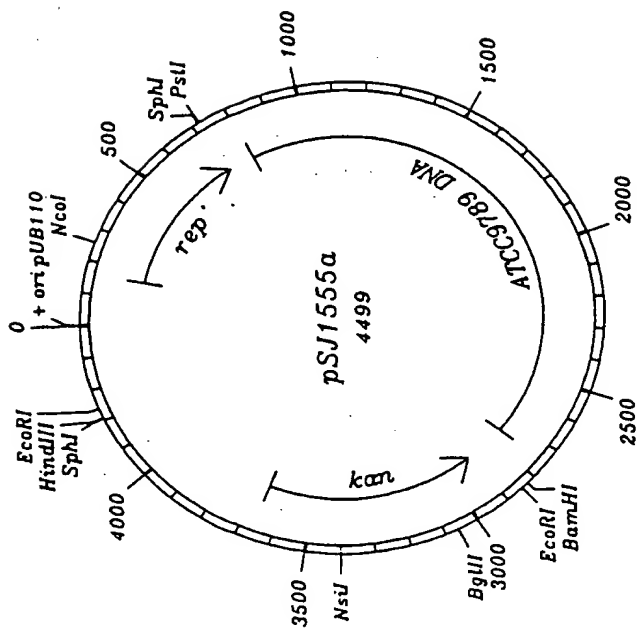


Fig. 30

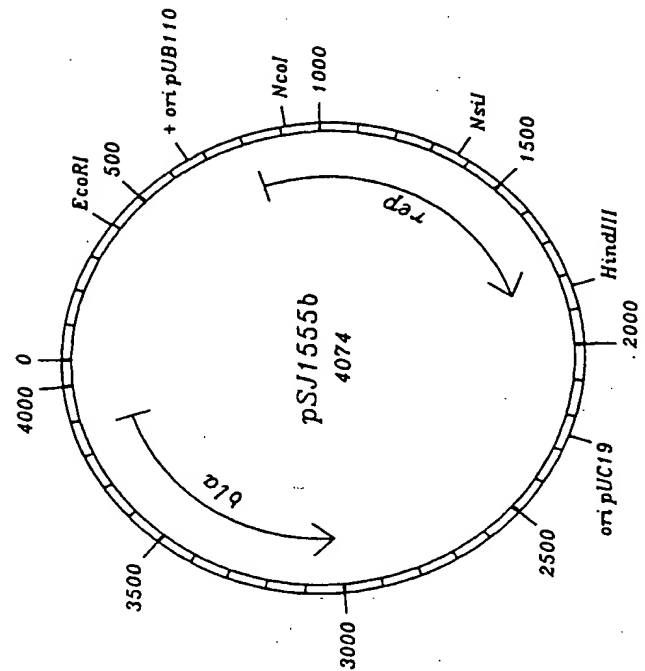


Fig. 31

要 約

細菌細胞であって、そのゲノム内に該細菌細胞が(1)対象のDNA配列、(2)該細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列及び(3)複製の起点を含んで成る組込み非複製型DNA作製体を保有しており、該DNA作製体は前記の複製起点からの複製の開始に必要なとされる因子をコードする機能的遺伝子を欠いている、前記細菌細胞。

補正書の翻訳文提出書 (特許法第184条の8)

平成4年6月18日

特許庁長官 深 沢 亘 殿

- 特許出願の表示
PCT/DK90/00332
- 発明の名称
細菌ゲノムにおけるDNAの安定な組込み
- 特許出願人

住 所 デンマーク国、デーコー-2880
バグスバエルト、ノボ アレ(番地なし)
名 称 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカプ

- 代 理 人
住 所 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号静光虎ノ門ビル
〒105 電話(3504)0721
氏 名 弁理士(6579) 青 木 朗
(外3名) 之青弁
印理士

- 補正書の提出年月日
1991年12月4日
- 添付書類の目録
補正書の翻訳文



1 通

請求の範囲

1. 細菌細胞であって、そのゲノム内に該細菌細胞が(1)対象のDNA配列、(2)細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列及び(3)複製の起点を含んで成る組込み非複製型DNA作製体を保有しており、該DNA作製体は該複製起点からの複製の開始に必要とされる因子をコードする機能的遺伝子を欠いている、該細菌細胞の製造方法であって、

以下の(a)および(b):

(a) 次の(i)~(v)の要素:

(i) 第1の複製起点; (ii) 該第1の複製起点からの複製のために必要とされる複製因子をコードする1又は複数の機能的遺伝子; (iii) 該第1の複製起点と同一の方向における第2の複製起点; (iv) 対象のDNA配列、及び(v) 該ベクターの導入を意図する細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列、を含んで成り、該親ベクターは該第2及び第1の複製起点(上記の順における)の間の領域にある、該第2の複製起点からの複製のために必要とされる複製因子をコードする機能的遺伝子を欠いている、

を含んでなる親プラスミドベクターを用いて細菌細胞を変質転換し、次いで

(b)

選択的条件下で形質転換された細胞を培養し、該プラスミドベクターの複製が、第1の複製起点からのプラスミドの複製に対して要求される因子をコードする機能的遺伝子に連結

した第1の複製起点を含んでなる第1の子孫ベクター並びに第2の複製起点(該第2の複製起点からプラスミドの複製に対して要求される因子をコードする機能的遺伝子を欠いている)および対象のDNA配列および細胞のゲノムの領域に相同性のDNA配列を含んでなる第2の子孫ベクターの形成を生ぜしめ、次いで選択的条件下で変質転換された細胞の培養を継続し、相同性組換えにより該第2の子孫ベクターを細菌ゲノム内に組込み更に細胞から第1の子孫ベクターおよび親ベクターの消失をもたらす、前記方法。

2. 第2の複製起点が、第1の複製起点と同じプラスミドから由来する、請求の範囲第1に記載の方法。

3. 第2の複製起点に連結した複製因子をコードする遺伝子が欠失してしまっている、請求の範囲第1項記載の方法。

4. 第2の複製起点と連結した複製因子をコードする遺伝子が改質されている、請求の範囲第1項記載の方法。

5. 前記遺伝子が、遺伝子のDNA配列の1個又はそれ以上のヌクレオチドの欠失、挿入又は置換により、又は転写もしくは翻訳開始もしくは停止シグナルの欠失により、改質されている、請求の範囲第4項記載の方法。

6. 親プラスミドベクターが、まだ宿主細胞を増殖せしめるような増加せしめられた温度では複製できないものであり、更に細菌細胞をプラスミドの複製を許容する温度で最初に培養し、引き続き第2の子孫ベクターを細菌ゲノムに組込んだ後、プラスミドの複製を許容しない温度で培養し、その結果第1の子孫ベクターおよび親ベクターが細胞から失われてい

る請求の範囲第1項記載の方法。

7. 親プラスミドベクターが、(i) 一本鎖DNAプラスミドからの第1のプラス起点; (ii) 第1のプラス起点と同族の機能的rep遺伝子; (iii) 該第1のプラス起点と同じ方向にある一本鎖DNAプラスミドからの第2のプラス起点; (iv) 対象のDNA配列、及び(v) 該プラスミドベクターの導入を意図する細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列を含んで成り、該親ベクターが該第2及び第1の複製起点(上記の方向における)の間の領域にある、該第2の複製起点に同族の機能的rep遺伝子を欠いている、請求の範囲第1~6項記載のいずれかに記載の方法。

8. 前記第2の複製プラス起点が、第1の複製プラス起点と同じ一本鎖DNAプラスミドから由来する、請求の範囲第7項記載の方法。

9. 対象のDNA配列が、対象のポリペプチドである、請求の範囲第1項記載の方法。

10. グラム陽性細菌の細胞である、請求の範囲第1~9項のいずれかに記載の方法。

11. 前記グラム陽性細菌の細胞が、バチルス(Bacillus)属又はストレプトマイシス(Streptomyces)属に属する株である、請求の範囲第10項記載の方法。

12. 前記細胞が、バチルス リシェニフォーミス(Bacillus licheniformis)、バチルス レンタス(Bacillus lentus)、バチルス

ブレビス(Bacillus brevis)、バチルス ステアロサーモフィリス(Bacillus stearothermophilus)、バチルス アルカロフィリス(Bacillus alkalophilus)、バチルス アミロリケファシエンス(Bacillus amyloliquefaciens)、バチルス コアギュランス(Bacillus coagulans)、バチルス スブチリス(Bacillus subtilis)又はストレプトマイシス リビダンス(Streptomyces lividans)の株である、請求の範囲第11項記載の方法。

13. 細菌細胞であって、そのゲノム内に該細菌細胞が(1)対象のDNA配列、(2)細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列及び(3)複製の起点を含んで成る組込み非複製型DNA作製体を保有しており、該DNA作製体は該複製起点からの複製の開始に必要とされる因子をコードする機能的遺伝子を欠いている、該細菌細胞の製造方法であって、

以下の(a)および(b):

(a) 次の(i)および(ii)の要素:

(i) 第1の複製起点および該第1の複製起点からの複製のために必要とされる(複製)因子をコードする1又は複数の機能的遺伝子を含んでなる第1のDNAベクターを用い、更に第2の複製起点(該第2の複製起点からのプラスミドの複製のために必要とされる因子をコードする機能的遺伝子を欠いている)並びに対象のDNA配列および細胞のゲノムの

領域に相同性のDNA配列を含んでなる第2のDNAベクターを用いて細菌細胞を変質転換し、次いで

(b)

選択的条件下で形質転換された細胞を培養し、相同性組換えにより該第2のDNAベクターを細菌ゲノム内に組み更に第1のDNAベクターの消失をもたらす、前記方法。

14. 第2の複製起点が、第1の複製起点と同じプラスミドから由来する、請求の範囲第13に記載の方法。

15. 第2のDNAベクターが第2の複製起点と連結した複製因子をコードする遺伝子が欠失してしまっている、請求の範囲第13項記載の方法。

16. 第2の複製起点と連結した複製因子をコードする遺伝子が改質されている、請求の範囲第13項記載の方法。

17. 前記遺伝子が、遺伝子のDNA配列の1種又はそれ以上のヌクレオチドの欠失、挿入又は置換により、又は転写もしくは翻訳開始もしくは停止シグナルの欠失により、改質されている、請求の範囲第16項記載の方法。

18. 前記第1のDNAベクターが、更に第2の複製起点と連結する複製因子をコードする機能性遺伝子を含んでなる、請求の範囲第13項記載の方法。

19. 前記第2のDNAベクターが、更に選択可能なマーカーを含んでなる、請求の範囲第13項記載の方法。

20. 第1のDNAベクターが一本鎖DNAプラスミドからの第1の複製プラス起点および機能的rep遺伝子を含んでなり、更に第2のDNAベクターが一本鎖DNAプラスミ

ドからの第2の複製プラス起点（これは、第2のプラス複製起点と同族の機能的rep遺伝子を欠いている）を含んでなり、更に対象のDNA配列および該細胞のゲノムの領域に相同性のDNA配列を含んでなる、請求の範囲第1～10項のいずれかに記載の方法。

21. 前記第2の複製プラス起点が、第1の複製プラス起点と同じ一本鎖DNAプラスミドから由来する、請求の範囲第20項記載の方法。

22. 前記第1のDNAベクターが、まだ宿主細胞を増殖せしめるような増加せしめられた温度では複製できないものであり、更に細菌細胞をプラスミドの複製を許容する温度で最初に培養し、引き続き第2のDNAベクターを細菌ゲノムに組込んだ後、プラスミドの複製を許容しない温度で培養し、その結果第1のDNAベクターが細胞から失われている請求の範囲第13項記載の方法。

23. グラム陽性細菌の細胞である、請求の範囲第13～22項のいずれかに記載の方法。

24. 前記グラム陽性細菌の細胞が、バチルス (Bacillus) 属又はストレプトマイセス (Streptomyces) 属に属する株である、請求の範囲第23項記載の方法。

25. 前記細胞が、バチルス リシエニフォーミス (Bacillus licheniformis)、バチルス レンタス (Bacillus lentus)、バチルス プレビス (Bacillus brevis)、バチルス

ステアロサーモフィリス (Bacillus stearothermophilus)、バチルス アルカロフィリス (Bacillus alkalophilus)、バチルス アミロリケファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens)、バチルス コアギュランス (Bacillus coagulans)、バチルス スブチリス (Bacillus subtilis) 又は ストレプトマイセス リビダンス (Streptomyces lividans) の株である、請求の範囲第24項記載の方法。

26. 親プラスミドベクターであって、(i) 第1の複製起点；(ii) 該第1の複製起点からのプラスミドの複製のために必要とされる（複数の）複製因子をコードする1又は複数の機能的遺伝子；(iii) 該第1の複製起点と同一の方向における第2の複製起点；(iv) 対象のDNA配列、及び(v) 該ベクターの導入を意図する細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列、を含んで成り、該親ベクターは該第2及び第1の複製起点（上記の順における）の間の領域にある、該第2の複製起点からの複製のために必要とされる複製因子をコードする機能的遺伝子を欠いている、

を含んでなる、前記親プラスミドベクター。

27. 第2の複製起点が、第1の複製起点と同じプラスミドから由来する、請求の範囲第26に記載のプラスミドベクター。

28. 第2の複製起点に連結した複製因子をコードする遺

伝子が欠失してしまっている、請求の範囲第26項記載のプラスミドベクター。

29. 第2の複製起点と連結した複製因子をコードする遺伝子が改質されている、請求の範囲第26項記載のプラスミドベクター。

30. 前記遺伝子が、遺伝子のDNA配列の1種又はそれ以上のヌクレオチドの欠失、挿入又は置換により、又は転写もしくは翻訳開始もしくは停止シグナルの欠失により改質されている、請求の範囲第29項記載のプラスミドベクター。

31. (i) 一本鎖DNAプラスミドからの第1の複製プラス起点；(ii) 第1のプラス起点に同族の機能的rep遺伝子；(iii) 第1のプラス起点と同一の方向にある一本鎖DNAプラスミドからの第2の複製プラス起点；(iv) 対象のDNA配列、及び(v) 該プラスミドベクターの導入を意図する細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列を含んで成り、該親ベクターが該第2及び第1の複製起点（上記の順における）の間の領域にある、該第2のプラス起点に同族の機能的rep遺伝子を欠いている、請求の範囲第26～30項記載のいずれかに記載のプラスミドベクター。

32. 前記第2の複製プラス起点が、第1の複製プラス起点と同じ一本鎖DNAプラスミドから由来する、請求の範囲第31項記載のプラスミドベクター。

33. 更に選択できるマーカーを含んでなる、請求の範囲第26～32項のいずれかに記載のプラスミドベクター。

34. 組換え体DNAベクターであって、(1) 対象の

DNA配列、(2)細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列及び(3)複製の起点を含んで成り、DNA作製体が該複製起点からの複製の開始に必要とされる因子をコードする機能的遺伝子を欠いている、前記組換え体DNAベクター。

35. 複製因子をコードする遺伝子が欠失してしまっている、請求の範囲第34項記載のベクター。

36. 複製因子をコードする遺伝子が不活性複製因子をコードするように改質されている、請求の範囲第34項記載のベクター。

37. 前記遺伝子が、遺伝子のDNA配列の1種又はそれ以上のスクレオチドの欠失、挿入又は置換により、又は転写もしくは翻訳開始もしくは停止シグナルの欠失により、改質されている、請求の範囲第36項記載のベクター。

38. 対象のDNA配列、該ベクターの導入を意図する細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列、一本鎖DNAプラスミドからの複製のプラス起点を含んでなる、ベクターであって、該ベクターがプラス起点と連結した機能的rep遺伝子を欠いている、請求の範囲第34～37項のいずれかに記載のベクター。

39. 更に選択できるマーカーを含んでなる、請求の範囲第34項に記載のベクター。

40. 細菌細胞であって、第1の複製起点および該第1の複製起点からの複製のために必要とされる複製因子をコードする1又は複数の機能的遺伝子を含んでなる第1のDNAベクターおよび、請求の範囲第34～39項のいずれかに記載

の第2のDNAベクターを含んでなる、前記細菌細胞

41. 細菌細胞であって、そのゲノム内に該細菌細胞が(1)対象のDNA配列、(2)該細胞のゲノム領域に相同性のDNA配列及び(3)複製の起点を含んで成る組込み非複製型DNA作製体を保有しており、該DNA作製体は前記の複製起点からの複製の開始に必要とされる因子をコードする機能的遺伝子を欠いている、前記細菌細胞。

42. 前記DNA作製体が、複製因子をコードする遺伝子を欠失してしまっている、請求の範囲第41項記載の細菌細胞。

43. 前記複製因子をコードする遺伝子が、不活性な複製因子をコードするように改質されているか、又は複製因子が遺伝子から発現されないように改質されている、請求の範囲第41項記載の細胞。

44. 前記遺伝子が遺伝子のDNA配列の1種又はそれ以上のスクレオチドの欠失、挿入又は置換により、又は転写もしくは翻訳開始もしくは停止シグナルの欠失もしくは他の改質により、改質されている、請求の範囲第43項記載の細胞。

45. 前記DNA作製体が、対象のDNA配列細胞の遺伝子の領域に相同性のDNA配列および一本鎖DNAプラスミドから複製のプラス起点を含んでなり、該DNA作製体が複製のプラス起点と同族の機能的rep遺伝子を欠いている、請求の範囲第41～44項のいずれかに記載の細胞。

46. 前記DNA作製体が更に選択できるマーカーを含んでなる、請求の範囲第41～45項のいずれかに記載の細胞。

リペプチドの生産に導く条件下で培養し、次いで得られたポリペプチドを培養物から回収することを含んでなる、前記方法。

52. 前記ポリペプチドが、酵素、例えばプロテアーゼ、アミラーゼ又はリパーゼである、請求の範囲第51項に記載の方法。

47. 前記対象のDNA配列が対象のポリペプチドをコードする、請求の範囲第41～45項のいずれかに記載の細胞。

48. グラム陽性細菌の細胞である、請求の範囲第41～47項のいずれかに記載の細胞。

49. 前記グラム陽性細菌の細胞が、バチルス (Bacillus) 属又はストレプトマイシス (Streptomyces) 属に属する株である、請求の範囲第48項記載の細胞。

50. 前記細胞が、バチルス リシェニフォーミス (Bacillus licheniformis)、バチルス レンタス (Bacillus lentus)、バチルス ブレビス (Bacillus brevis)、バチルス ステアロサーモフィリス (Bacillus stearothermophilus)、バチルス アルカロフィリス (Bacillus alkalophilus)、バチルス アミロリケファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens)、バチルス コアギュランス (Bacillus coagulans)、バチルス スブチリス (Bacillus subtilis) 又は ストレプトマイシス リビダニス (Streptomyces lividans) の株である、請求の範囲第49項記載の細胞。

51. 対象のポリペプチドの調製方法であって、該ポリペプチドに対してコードする組込まれたDNA配列を有する請求の範囲第41～50項のいずれかに記載の細菌細胞を、ポ

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC IPC5: C 12 N 15/68, 15/63		
2. FIELDS SEARCHED Minimum Documentation Standard?		
Classification System	Classification Symbols	
IPC5	C 12 N	
Documentation searched other than Minimum Documentation to the extent that such documents are included in Field Search?		
SE, DK, FI, NO classes as above		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹		
Category ²	Class of Document ¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹¹
X	Journal of Bacteriology, Vol. 171, No. 5, May 1989 Michael Young et al.: "Stability of Reiterated Sequences in the Bacillus subtilis Chromosome", see page 2653 - page 2656	1-17
X	US, A, 4631257 (DAVID H. GELFAND) 23 December 1986, see column 3 lines 37-62	1-4, 43-44
A	US, A, 4401761 (JACK J. MANIS ET AL.) 30 August 1983, see the whole document	1-17, 43-44
<p>¹ Special categories of cited documents¹⁰</p> <p>"A" Document reflecting the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" Prior art document published on or after the international filing date</p> <p>"C" Document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the submission date of related inventions or other technical features (as indicated)</p> <p>"D" Document referred to in an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"E" Document published prior to the international filing date but after the date of the international search</p> <p>"F" Later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to substantiate the prior art or clarify the invention</p> <p>"G" Document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or claimed on the basis of the document</p> <p>"H" Document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with any or more other such documents, each considered on its merits in a particular context in the art</p> <p>"I" Document member of the same patent family</p>		
4. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of the International Search Report	
18th March 1991	1991 -03- 19	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
SWEDISH PATENT OFFICE	Yvonne Sjöström	

Form PCT/INT/210 (second sheet) (January 1989)

This report shows the patent family members relating to the patent documents cited in the international search report. The members are as contained in the Swedish Patent Office IEP file on 91-02-28. The Swedish Patent Office is in no way liable for those particular units are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 4631257	86-12-23	AU-B- 554700	86-08-28
		AU-D- 8274782	82-09-14
		CA-A- 1198067	85-12-17
		EP-A- 0060045	82-09-15
		JP-A- 57172000	82-10-22
		US-A- 4966840	90-10-30
		WO-A- 82/02901	82-09-02
		AT-T- 2340	83-02-15
		AU-B- 531722	83-09-01
		AU-D- 5392279	80-07-03
		EP-A-B- 0013830	80-08-06
		JP-A- 55104888	80-08-11
US-A- 4401761	83-08-30	EP-A- 0058002	82-08-18
		JP-A- 57144981	82-09-07
		US-A- 4338400	82-07-06

第1頁の続き

⑨Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

C 12 N 15/63
C 12 P 21/02
//C 12 N 1/21
C 12 R 1:07
(C 12 N 1/21
C 12 R 1:465)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:07)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:465)

C 8214-4B

⑩発明者 ヨーゲンセン, ヘル リノ

デンマーク国, デーコー-1302 コペンハーゲン コー., ドロニ
ンゲン ス トバケルガゼ 37. 1

⑪発明者 デイデリチセン, ベーゲ クラ
ウ

デンマーク国, デーコー-3460 ビーケロエド, フグレサングスバ
イ 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)